

Funktionelle und histologische Untersuchungen
der FGF-2-Isoformen im Regenerationsmodell
des Nervus ischiadicus der adulten Ratte
(Rattus norvegicus) -
Transplantation genetisch modifizierter
Schwann-Zellen

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation von
Dipl.-Biol. Esther Lipokatic
geboren am 21. Juni 1975 in Hildesheim

2005

Referent: Prof. Dr. Claudia Grothe
Institut für Neuroanatomie, Medizinische Hochschule Hannover

Koreferent: Prof. Dr. Stephan Steinlechner
Institut für Zoologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 22 November 2005

...ging es nach mir, sollten wir wieder öfter in den Himmel schauen,
denn manchmal fehlt es uns schon sehr an Gelassenheit, an Vertrauen
die kleinen Dinge machen es schön,
auch wenn sie schnell vergehen
es ist gut, Menschen lachen zu sehen...

Sportfreunde Stiller, Siehst du denn das genauso?

Zusammenfassung

In der Entwicklung alternativer Therapien zur Wiederherstellung peripherer Nervenfunktionen nach Verletzungen spielen Schwann-Zellen eine zentrale Rolle. Schwann-Zellen bilden ein regenerationsförderndes Milieu am Ort der Verletzung. Neben anderen Proteinen wird der Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2) nach Nervenverletzungen vermehrt exprimiert. FGF-2 kommt in 3 verschiedenen Isoformen, der niedermolekularen Isoform (18-kDa-FGF) und den höher molekularen Isoformen (HMW-FGF-2), vor. Unterschiedliche Zeit- und Lokalisationsmuster der Expression der verschiedenen FGF-2-Isoformen nach Nervenläsion führten zu der Annahme unterschiedlicher biologischer Funktionen der Isoformen in der peripheren Nervenregeneration.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden Schwann-Zellen genetisch derart modifiziert, dass sie entweder 18-kDa-FGF-2 oder HMW-FGF-2 überexprimierten. Die FGF-2-überexprimierenden Schwann-Zellen wurden in Silikonröhrchen zwischen den proximalen und distalen Stümpfen der durchtrennten Nervi ischiadici adulter Ratten eingebracht. Mittels funktioneller und morphometrischer Analysen wurde nach 3 und 6 Monaten Beobachtungszeitraum untersucht, ob die FGF-2-überexprimierenden Schwann-Zellen die Nervenregeneration steigern und ob die verschiedenen Isoformen Unterschiede bzgl. der Qualität und Quantität der axonalen Regeneration zeigen. Nach Überexpression von HMW-FGF-2 durch transplantierte Schwann-Zellen kam es zu einer schnelleren Rückkehr sensorischer Funktionen, und eine höhere Anzahl sensorischer Neurone aus den Spinalganglien hatte sich nach 6 Monaten an der Regeneration beteiligt. Außerdem verminderte 18-kDa-FGF-2 nach 3 Monaten den Grad und die Distanz der Remyelinisierung regenerierender Axone im Vergleich zu Kontrollexperimenten, während sie bei *in vivo*-Überexpression von HMW-FGF-2 über weite Distanzen und in höherem Grad erfolgte. Somit scheint HMW-FGF-2 sowohl die sensorische Nervenregeneration als auch die Remyelinisierung zu fördern.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche biologische Effekte unterschiedlicher *in vivo* überexprimierter FGF-2-Isoformen aufgedeckt. Die gewonnenen Kenntnisse tragen zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien in der peripheren Nervenregeneration bei.

Schlagwörter: Periphere Nervenregeneration, FGF-2-Isoformen, Schwann-Zellen, Somatischer Gentransfer

Summary

Schwann cells play an important role in the development of alternative therapies to enhance functional peripheral nerve recovery after nerve lesions because they generate a regeneration-supporting environment at the side of the nerve lesion.

In addition to other proteins, the expression of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) is upregulated after nerve lesions. FGF-2 is expressed in 3 different isoforms, the low molecular weight isoform (18-kDa-FGF-2) and the high molecular weight isoforms (HMW-FGF-2). Different time and localization pattern of the expression of the different FGF-2-isoforms after nerve lesions suggest different biological functions of the isoforms in the peripheral nerve regeneration.

To investigate this hypothesis, Schwann cells were genetically modified to over-express either the 18-kDa-FGF-2 or the HMW-FGF-2. The FGF-2-over-expressing Schwann cells were implanted within a silicon tube between the proximal and distal nerve stumps of the transected sciatic nerves of adult rats. Functional and morphometrical analyses were carried out after 3 and 6 months, to investigate the regeneration capacities of FGF-2-over-expressing Schwann cells and to reveal differences between the over-expression of the different FGF-2-isoforms regarding to quality and quantity of the axonal regeneration.

After over-expression of HMW-FGF-2 by transplanted Schwann cells, a faster recovery of sensory function could be observed and a higher number of sensory neurons from the dorsal root ganglia were involved in regeneration after 6 months.

Moreover, after 3 months 18-kDa-FGF-2 reduced the grade and distance of remyelination of regenerating axons compared to control experiments, whereas after *in vivo* over-expression of HMW-FGF-2 the remyelination resulted in a higher grade of myelination and long distance myelination. Therefore, HMW-FGF-2 seems to stimulate both the sensory nerve recovery and the remyelination.

According to the results of this study, different biological effects after over-expression of different FGF-2-isoforms were revealed. The gained knowledge contributes to the development of new therapeutic strategies in peripheral nerve repair.

Keywords: Peripheral nerve regeneration, FGF-2-isoforms, Schwann cells, somatic gene transfer

Inhaltsverzeichnis

I.	EINLEITUNG	1
1.	ANATOMIE UND FUNKTION DES NERVENSYSTEMS	4
2.	DEGENERATIONS- UND REGENERATIONSVORGÄNGE NACH DURCHTRENNUNG EINES PERIPHEREN NERVEN	7
2.1	VERÄNDERUNGEN AM DISTALEN UND PROXIMALEN AXONABSCHNITT : WALLERSCHE DEGENERATION, AXONALE REGENERATION UND NEUROMBILDUNG	8
3.	EXPERIMENTELLE ÜBERBRÜCKUNGSMÖGLICHKEITEN NACH EINER NERVENLÄSION	12
3.1	INTERPONATMODELLE	12
3.2	BEFÜLLUNGSMÖGLICHKEITEN DER INTERPONATE	13
3.3	FIBROBLASTEN WACHSTUMSFAKTOR-2 (FGF-2)	15
4.	WISSENSCHAFTLICHE FRAGESTELLUNG	18
II.	MATERIAL UND METHODEN	21
1.	VERWENDETE CHEMIKALIEN, GERÄTE UND COMPUTERPROGRAMME	21
1.1	CHEMIKALIEN UND LÖSUNGEN	21
1.4	SONSTIGE MATERIALIEN	23
2.1	VERSUCHSDESIGN	24
3.	ZELLKULTURTECHNIK	25
4.	OPERATIONSTECHNIK / IMPLANTATION	26
5.1	MOTORISCHE REGENERATION	28
5.2	SENSORISCHE REGENERATION	31
6.1	ELEKTROPHYSIOLOGIE	32
6.2	NEURONENMARKER DiI	33
6.2.1	APPLIKATION VON DiI ZUR MARKIERUNG DER IN DEN REGENERIERTEN NERVEN PROJIZIERENDEN NEURONE	33
6.2.2	GEWEBEAUFARBEITUNG DER DRGS UND DES RÜCKENMARKS NACH FLUORESZENZMARKIERUNG	33
6.2.3	FLUORESZENZMIKROKOPIE UND AUSWERTUNG	34
7.	EXPLANTATION DES REGENERIERTEN GEWEBES UND GEWEBEAUFARBEITUNG	35
8.	QUANTITATIVE ANALYSE DES REGENERATIONSERFOLGES	37
9.	ULTRASTRUKTURELLE AUSWERTUNG DES REGENERATIONSERFOLGES ANHAND ELEKTRONENMIKROSKOPISCHER BILDER	38
10.	STATISTISCHE AUSWERTUNG	38

III. ERGEBNISSE-----39

1.	3 MONATS-STUDIE-----	39
1.1	ANALYSE DER FUNKTIONELLEN REGENERATION-----	39
1.2	QUANTITATIVE ANALYSE DES REGENERATIONSERFOLGES-----	42
1.2.1	DISTANZ REGENERierter MYELINISierter FASERN -----	42
1.2.2	ANZAHL REGENERierter MYELINISierter AXONE-----	43
1.2.3	DURCHMESSER REGENERierter MYELINISierter AXONE -----	47
1.2.4	G-RATIO REGENERierter MYELINISierter AXONE -----	48
1.2.5	ANTEIL AN VASKULARISierter FLÄCHE AM GESAMTQUERSCHNITT -----	52
1.3	ULTRASTRUKTURELLE ANALYSE DER REGENERATE -----	53
2.	6 MONATS-STUDIE-----	55
2.1	ANALYSE DER MOTORISCHEN REGENERATION -----	55
2.2	ANALYSE DER SENSORISCHEN REGENERATION-----	57
2.3	QUALITATIVE ANALYSE DES REGENERATIONSERFOLGES -----	59
2.3.1	RETROGRADE MARKIERUNG AN DER REGENERATION BETEILIGTER NEURONE MIT DiI-59	
2.3.2	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE MESSUNGEN -----	61
2.4	QUANTITATIVE ANALYSE DES REGENERATIONSERFOLGES-----	63
2.4.1	ANZAHL REGENERierter KABEL MIT DURCHGEHEND MYELINISierten AXONEN-----	63
2.4.2	ANZAHL, DURCHMESSER UND G-RATIO REGENERierter MYELINISierter AXONE -----	64
2.5	ULTRASTRUKTURELLE ANALYSE DER REGENERATE -----	66

IV. DISKUSSION-----69

1.	TIERMODELL-----	69
2.	IMPLANTAT -----	70
3.	FUNKTIONELLE REGENERATION -----	71
3.1	MOTORISCHE REGENERATION -----	72
3.2	SENSORISCHE REGENERATION -----	75
4.	ELEKTROPHYSIOLOGISCHE MESSUNG -----	77
5.	RETROGRADE MARKIERUNG AN DER REGENERATION BETEILIGTER NEURONE MIT DiI-79	
6.	QUANTITATIVE REGENERATION -----	81
6.1	DISTANZ REGENERierter MYELINISierter AXONE-----	81
6.2	ANZAHL REGENERierter MYELINISierter AXONE -----	83

6.3	DURCHMESSER REGENERIERTER MYELINISierter AXONE -----	87
6.4	G-RATIO -----	88
6.5	BLUTGEFÄSSE-----	90
7.	ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION-----	91
8.	AUSBLICK -----	94
 VI. LITERATURVERZEICHNIS -----		97
 VII. ANHANG-----		114

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µm ²	Quadratmikrometer
Abb.	Abbildung
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
bzgl.	Bezüglich
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
cm	Zentimeter
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CO ₂	Kohlendioxid
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanin perchlorat
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DRG	Dorsal root ganglia / Spinalganglion
EGF	Epidermal growth factor
EMG	Elektromyogramm
EVA	Ethylenvinylacetat
FGF-2	Fibroblast growth factor-2 / Fibroblastenwachstumsfaktor-2
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
GDNF	Glia derived neurotrophic factor
h	Stunde
HMW	High molecular weight (21/23-kDa-FGF-2-Isoformen)
Hz	Hertz
IGF	Insulin like growth factor
IL-6	Interleukin-6
ITS	Intermediate toe spread
kDa	Kilodalton
KF	kollagene Fasern
kg	Kilogramm
KV	Kontrollvektor
L1	Cell adhesion molecule L1
m	Meter
M	Molar
M.	Musculus
MA	Myelinisiertes Axon
MA*	Axon mit beginnender Myelinisierung
mA	Milliampere
MAG	Myelin-assoziiertes-Glykoprotein
MAP(s)	Muskelaktionspotential(e)

mg	Milligramm
MHH	Medizinische Hochschule Hannover
min	Minute
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde
n	Tierzahl
N.	Nervus
neo	neonatal
Nn.	Nervi
NaCl	Natriumchlorid
N-Cam	Neural cell adhesion molecule
NGF	Nerve growth factor
nm	Nanometer
NT-3/4/5	Neurotrophin-3/4/5
OEC	Olfactoric ensheathing cell
OP	Operation
P0	Myelinprotein Null
p75 ^{LNGFR}	Niedrig affiner Nervenwachstumsfaktorrezeptor
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PFA	Paraformaldehyd
PL	Print length
PLA	Polyactidacid
PLGA	Poly-L-glycolocacid
PNS	Peripheres Nervensystem
PVC	Polyvinylchlorid
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler
SFI	Sciatic Function Index
SZ	Schwann-Zelle
Tab.	Tabelle
TGF	Transforming growth factor
TS	Toe spread
UM	Nicht-myelinisiertes Axon
z.B.	Zum Beispiel
ZK	Zellkern
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZTL	Zentrales Tierlabor

I. Einleitung

Verletzungen des peripheren Nervensystems (PNS), besonders im Bereich des Plexus brachialis, entstehen häufig durch Unfälle (NAGANO *et al.*, 1984). Mit solchen Verletzungen gehen meistens Funktionsverluste und Störungen der Sensibilität der Extremitäten einher.

Es wird unterschieden zwischen Axonotmesis, einer Unterbrechung der Kontinuität endoneuraler Strukturen und Axone im peripheren Nerven bei erhaltener Nervenhülle, und Neurotmesis, komplette Durchtrennung peripherer Nerven mit Durchtrennung von Nervenfasern und Nervenhülle (EVANS, 2001; MUMENTHALER *et al.*, 1998; STOLL *et al.*, 2002).

Da ab einer kritischen Distanz zwischen dem proximalen und distalen Nervenstumpf eine spontane Regeneration peripherer Nerven nicht mehr möglich ist (BUTI *et al.*, 1996; LUNDBORG *et al.*, 1982), ist im Falle einer Neurotmesis eine spannungsfreie End-zu-End-Anastomose der Nervenstümpfe das Mittel der Wahl, um eine Wiederherstellung der Nervenfunktion zu erreichen. Dies ist jedoch nur möglich, wenn der Substanzverlust des Nerven nicht zu groß ist. In diesem Fall ist die Transplantation von autologem Nervengewebe zur Überbrückung der entstanden Nervenlücke die Methode der ersten Wahl. Die Verfügbarkeit autologer Spendergewebe ist allerdings limitiert (IDE *et al.*, 1998; LUNDBORG, 2004; RODRIGUEZ *et al.*, 2000; SCHMIDT & LEACH, 2003). Das Einsetzen allogener Nerventransplantate birgt den Nachteil von Abstoßungsreaktionen und erfordert den Einsatz von Immunsuppressiva (MOSAHEBI *et al.*, 2002).

Eine experimentelle Alternative zu diesen Verfahren ist das „Tissue Engineering“. Es bezeichnet die Herstellung eines Interponates aus synthetischen und natürlichen Substanzen (EVANS, 2001; NAKAMURA *et al.*, 2004; SCHMIDT & LEACH, 2003). Zusätzlich kann ein solches Interponat mit verschiedenen Substanzen befüllt werden, die die Nervenregeneration fördern.

Da aus der Literatur die zentrale Rolle von Schwann-Zellen für die periphere Nervenregeneration bekannt ist (ANSSELIN *et al.*, 1997; BUNGE, 1993; GUENARD *et al.*, 1992), sollten sie in einem Nervenimplantat vorhanden sein (LUNDBORG, 2004). Ebenfalls wird die Nervenregeneration durch neurotrophe Faktoren

gefördert. Besonders viel versprechend erscheint dabei der Fibroblastenwachstumsfaktor-2 (FGF-2), denn verschiedene Arbeiten zeigten eine entscheidende Rolle von FGF-2 im Rahmen der peripheren Nervenregeneration. So wurde z.B. nach Freisetzung von FGF-2 aus synthetischen Nervenimplantaten eine Stimulation der axonalen Regeneration beschrieben (AEBISCHER *et al.*, 1989; DANIELSEN *et al.*, 1988). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass FGF-2, welches als niedermolekulare (18-kDa-FGF-2) und höher molekulare (21-kDa-FGF-2, 23-kDa-FGF-2, beide Isoformen werden im Folgenden zusammen als HMW-FGF-2-Isoformen bezeichnet) Isoformen vorkommt, nach Nervenverletzungen im PNS hochreguliert wird, wobei die verschiedenen Isoformen in ihrer Expression unterschiedliche Zeit- und Verteilungsmuster aufweisen (GROTHE *et al.*, 2000; MEISINGER & GROTHE, 1997). Daher werden für die verschiedenen Isoformen unterschiedliche biologische Effekte postuliert (GROTHE *et al.*, 2000; MEISINGER & GROTHE, 1997).

Die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Grothe untersucht die spezifischen biologischen Funktionen der verschiedenen FGF-2-Isoformen und deren Einfluss auf die Nervenregeneration. Zur Untersuchung der Effekte der verschiedenen FGF-2-Isoformen *in vivo* wurde ein Tiermodell an der adulten Ratte etabliert, in dem adulten Ratten zwischen die Nervenstümpfe des durchtrennten Nervus (N.) ischiadicus Schwann-Zellen implantiert wurden, die sich in einem Silikon-Interponat befanden. Diese Schwann-Zellen waren genetisch derart verändert, dass sie die HMW-FGF-2-Isoformen überexprimierten. In einer dieser Arbeit vorangegangenen Studie konnte nach Transplantation von HMW-FGF-2-überexprimierenden Schwann-Zellen ein regenerationsfördernder Effekt von HMW-FGF-2 festgestellt werden (TIMMER *et al.*, 2003).

Auf diese Ergebnisse aufbauend und unter Berücksichtigung der möglichen unterschiedlichen biologischen Effekte der verschiedenen FGF-2-Isoformen war es das Ziel dieser Arbeit, die spezifischen Funktionen der FGF-2-Isoformen bei der peripheren Nervenregeneration über große Distanzen *in vivo* aufzuklären. In einer Langzeitstudie wurden deshalb 18-kDa-FGF-2- und HMW-FGF-2-überexprimierende neonatale Schwann-Zellen in einem Silikonröhrchen

zwischen den proximalen und distalen Stumpf des durchtrennten N. ischiadicus adulter Ratten implantiert. Die so überbrückte Distanz zwischen den Nervenstümpfen betrug 15 mm, ein Abstand über den eine spontane Regeneration des Nerven durch leere Silikonröhrchen nicht erwartet werden kann (FRANCEL *et al.*, 1997; LUNDBORG *et al.*, 1982). Der Regenerationserfolg wurde quantitativ und qualitativ mittels funktioneller Test und morphometrischer Analysen beurteilt.

1. Anatomie und Funktion des Nervensystems

Das Nervensystem der Vertebraten entstammt dem Ektoderm, aus dem sich während der Embryonalentwicklung die Neuralplatte bildet, deren Ränder sich verdicken und die Neuralrinne bilden. Die Ränder der Neuralrinne bewegen sich aufeinander zu und verschmelzen zum Neuralrohr, aus dem das gesamte Zentralnervensystem (ZNS) entsteht. Zum ZNS gehören Gehirn und Rückenmark. Bei der Verschmelzung der Ränder der Neuralrinne zum Neuralrohr lösen sich einige Zellen von der Dorsalseite des Neuralrohrs und wandern aus diesem aus. Sie werden als Neuralleistenzellen bezeichnet. Diese Zellen wandern in alle Bereiche des Körpers und differenzieren sich am Zielort in Zell- und Gewebetypen. Unter anderem sind sie die Vorläuferzellen für das PNS. Zum PNS gehören die Spinalganglien (Dorsal root ganglia = DRGs) und die peripheren Nerven, die außerhalb von Gehirn und Rückenmark verlaufen (LÜLLMANN-RAUCH, 2003).

Nervenzellen (Neurone) sind die kleinste Funktionseinheit des Nervensystems und bestehen aus dem Zellkörper (Perikaryon), Dendriten und einem Axon. Man unterscheidet bei Nervenzellen zwischen multipolaren Nervenzellen, welche aus einem Axon und mehreren Dendriten bestehen, bipolaren Nervenzellen, die aus einem Axon und einem Dendriten bestehen und pseudounipolaren Nervenzellen, welchen ein Fortsatz entspringt, der sich in einen zur Peripherie und einen zum ZNS führenden Ast aufzweigt. Der Grossteil der Nervenzellen ist multipolar und hat mehrere Dendriten, die unterschiedlich stark verzweigte Fortsätze bilden (Dendritenbaum) und so eine charakteristische Form für jeden Nervenzelltyp zeigen. Die Dendriten empfangen Informationen von anderen Nerven- oder Sinneszellen in Form von chemischen Signalen (Neurotransmitter) und leiten diese als elektrische Signale in Richtung des Zellkörpers weiter. Das Axon einer Nervenzelle verlässt den Zellkörper am Axonhügel. Die axonale Endigung eines präsynaptischen Neurons überträgt an der Synapse Signale auf nachgeschaltete postsynaptische Neurone. Motorische Axone leiten elektrische Signale vom Zellkörper, der im ventralen Vorderhorn des Rückenmarks liegt, weg und führen

sie den Zielorganen zu (JOHNSON, 2004; JUNQUEIRA *et al.*, 2002; KANDEL *et al.*, 1996; LÜLLMANN-RAUCH, 2003).

Zellkörper und Axon sind von Gliazellen umgeben. Sie erfüllen unter anderem Stütz- und Isolationsfunktionen. Im Nervensystem der Säuger kommen drei Typen von Gliazellen vor: Schwann-Zellen, Oligodendrocyten und Astrocyten. Oligodendrocyten sind die myelinisierenden Gliazellen des ZNS und Schwann-Zellen die myelinisierenden Gliazellen des PNS. Eine Nervenfaser besteht aus einem Axon und der dazugehörigen Gliahülle.

Da sich diese Arbeit vor allem mit dem PNS beschäftigt, wird im Folgenden nur der Aufbau des PNS dargestellt.

Das PNS besteht aus den DRGs, die eine Anhäufung der Zellkörper von pseudounipolaren sensorischen Nervenzellen sind, bei denen nur ein gemeinsamer Fortsatz aus dem Perikaryon entspringt, der sich erst in einiger Entfernung vom Zellkörper funktionell in einen Dendriten (Reizaufnahme) und einen Neuriten (Reizweiterleitung) gabelt, welche aber beide axonale Strukturen aufweisen. Zur Vereinfachung der Terminologie werden im Folgenden Dendriten als sensorische Axone / Fasern und Neuriten als motorische Axone / Fasern bezeichnet. Weiterhin gehören zum PNS die Axone der Motoneurone, deren Zellkerne im Rückenmark lokalisiert sind. Periphere Nerven sind meist gemischte Nerven und bestehen sowohl aus sensorischen und motorischen als auch aus sympathischen Fasern (JUNQUEIRA *et al.*, 2002; LÜLLMANN-RAUCH, 2003). Abb. 1 zeigt eine schematische Darstellung des PNS.

Eine Nervenfaser besteht aus einem Axon und den dazugehörigen Schwann-Zellen. Man unterscheidet zwischen nicht-myelinisierten und myelinisierten Axonen. Nicht-myelinisierte Axone werden auf ihrer gesamten Länge von einer durchgehenden Basallamina umgeben, die von Schwann-Zellen gebildet wird. Eine Schwann-Zelle umgibt immer mehrere nicht-myelinisierte Axone. Wird ein Axon von der Plasmamembran des Ausläufers einer Schwann-Zelle in mehreren Schichten umwickelt, spricht man von myelinisierten Axonen. Als Myelin werden die eng aneinander liegenden Schichten der Plasmamembran bezeichnet. Es dient zur elektrischen Isolierung des Axons. Die Myelinschicht entlang eines myelinisierten Axons weist in regelmäßigen Abständen Unterbrechungen auf, die

Ranvier-Schnürringe. Diese Unterbrechung der Myelinscheide ermöglicht eine schnelle Erregungsleitung (Saltatorische Erregungsleitung). Myelinisierte Fasern leiten ca. 60mal schneller als nicht-myelinisierte Axone (LÜLLMANN-RAUCH, 2003). Im N. ischiadicus der Ratte beträgt der Anteil an myelinisierten motorischen Fasern ca. 6 %, der Anteil myelinisierter sensorischer Fasern ca. 23 %, der Anteil unmyelinisierter sensorischer Fasern 48 % und der Anteil an sympathischen Fasern, welche nicht-myelinisiert sind, ca. 23 % (SCHMALBRUCH, 1986).

Die die Axone umhüllenden Schwann-Zellen sind von einer Bindegewebshülle, dem Endoneurium, umgeben. Mehrere Nervenfasern werden durch weitere Bindegewebsschichten, dem so genannten Perineurium, zu Faszikeln zusammengefasst. In großen Nerven werden viele dieser Faszikel vom bindegewebigen Epineurium umschlossen (JUNQUEIRA *et al.*, 2002).

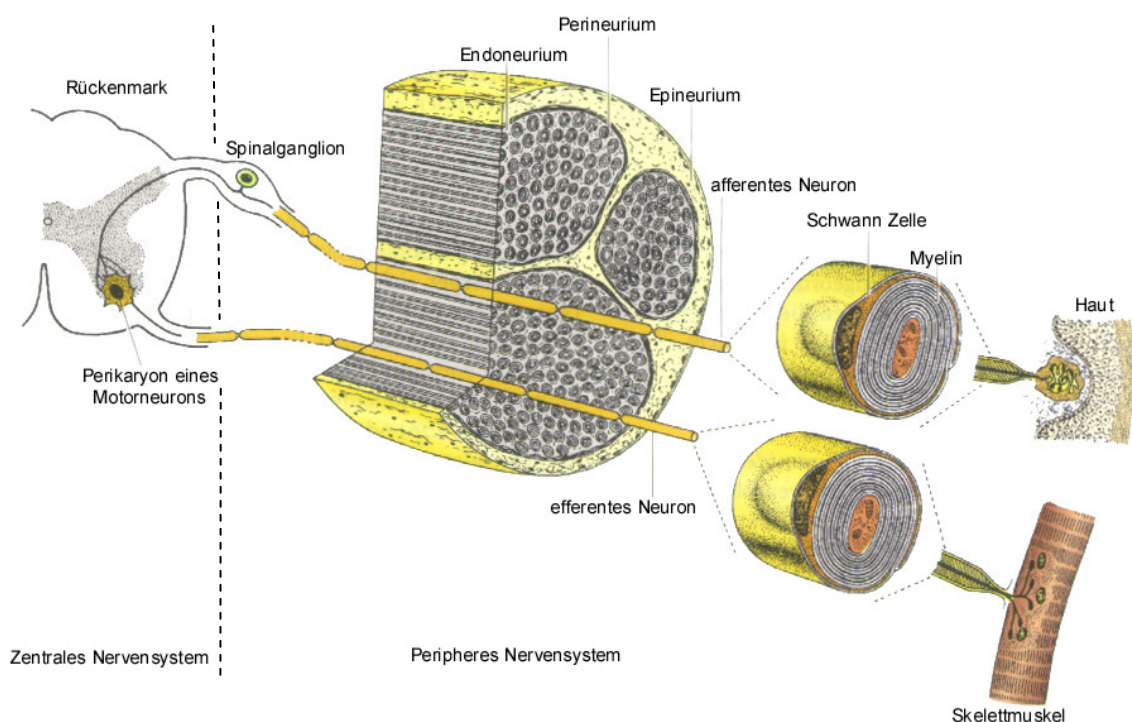


Abb. 1 Schematische Darstellung eines gemischten peripheren Nerven. Die Zellsomata der afferenten sensorischen Axone liegen in den DRGs. Die Zellkörper der efferenten motorischen Axone sind im Rückenmark lokalisiert, welches zum ZNS gehört. Gut erkennbar ist die Wicklung der Schwann-Zellen um die Axone. (modifiziert nach JUNQUEIRA *et al.*, 2002).

2. Degenerations- und Regenerationsvorgänge nach Durchtrennung eines peripheren Nerven

Verletzungen peripherer Nerven entstehen meist durch akute mechanische Einwirkungen, wobei zwischen scharfen und stumpfen Gewalteinwirkungen differenziert werden muss. Unter scharfen Gewalteinwirkungen versteht man Stich-, Schnitt- und Sägeverletzungen. Stumpfe Nervenverletzungen sind häufig auf Dehnungsschäden durch Unfälle, Operationen oder Lagerungen zurückzuführen (STÖHR & KRAUS, 2002). Weiterhin können Schädigungen peripherer Nerven durch Tumorbildung oder virale Infektionen ausgelöst werden (STOLL & MULLER, 1999). Regenerationsprozesse im peripheren Nerven sind abhängig von Spezies, Alter, Art der Schädigung, örtlichen Stoffwechselbedingungen und der Entfernung der Läsion vom Zellkörper (DIETZMANN, 1990).

Je nach Form der Schädigung eines Nerven erfolgt die klinische Einteilung traumatischer Nervenläsionen, da unterschiedliche Traumata jeweils verschiedener Behandlungen bedürfen (MILLES, 1997; SEDDON, 1943; SUNDERLAND, 1951). SEDDON (1943) unterscheidet zwischen drei Formen der Schädigung: (1) der Neurapraxie, einer reversiblen Funktionsstörung eines peripheren Nerven z.B. nach Nervenquetschung mit erhaltener Kontinuität des Nerven, bei der es zu einem segmentalen Zerfall der Myelinscheide kommt, (2) der Axonotmesis, einer peripheren Nervenläsion mit Unterbrechung der Kontinuität der Axone bei erhaltenen Nervenwänden und (3) Neurotmesis, einer vollständigen Durchtrennung der Nervenfasern, einschließlich der Nervenwand. SUNDERLAND (1951) übernahm die Neurapraxie und Axonotmesis und bezeichnete sie als Schaden I. Grades und Schaden II. Grades. Die Neurotmesis differenzierte er je nach Kontinuitätsverlust einzelner Gewebe in Schaden III. Grades (Kontinuitätsverlust des Epineuriums), Schaden IV. Grades (zusätzlich zu Grad III Kontinuitätsverlust des Perineuriums) und Schaden V. Grades (zusätzlich zu Grad IV Kontinuitätsverlust des Endoneuriums). Grad V nach SUNDERLAND (1951) ist also durch einen kompletten Verlust der Kontinuität definiert.

Wird die Kontinuitätstrennung durch ein glattes Durchtrennen des Nerven verursacht, ist die Schädigung des proximalen und distalen Nervenstumpfes gering und die Kontinuität kann durch eine End-zu-End-Anastomose wieder hergestellt werden. Kommt es bei der Nervendurchtrennung allerdings zur Zerstörung von Nervengewebe, ergibt sich zwischen beiden Nervenstümpfen eine Unterbrechung, aus der zwei unterschiedliche Nervenabschnitte resultieren. Vom proximalen Nervenstumpf, der weiterhin mit dem Zellkörper verbunden ist, geht eine axonale Regeneration aus, während der distale Abschnitt die Wallersche Degeneration durchläuft (KANDEL *et al.*, 1996; MUMENTHALER *et al.*, 1998).

2.1 Veränderungen am distalen und proximalen Axonabschnitt : Wallersche Degeneration, axonale Regeneration und Neuombildung

Kommt es durch eine Läsion zur Durchtrennung eines Nerven, führt dies zur anterograden Degeneration des distalen Axonabschnitts. Dieser Vorgang wird nach dem Physiologen August Waller als Wallersche Degeneration bezeichnet (WALLER, 1850). Die Degeneration beginnt am Ort der Faserdurchtrennung und verläuft anterograd nach distal mit einer Geschwindigkeit, die der Dicke und der Internodallänge proportional ist. Mit dem Zerfall der Axone geht der Zerfall der Myelinscheide einher, wobei ihre Fragmente als Myelinovoide sichtbar werden. Das Myelin wird sowohl von Schwann-Zellen als auch von einwandernden Makrophagen phagozytiert (HIRATA & KAWABUCHI, 2002). Die Latenz bis zu ihrem Beginn und die Geschwindigkeit der Degeneration sind abhängig vom betroffenen Fasertyp. Letztere beträgt bei dünnen Markfasern etwa 25 h und bei dicken Markfasern etwa 45 h (MUMENTHALER *et al.*, 1998).

Während der distale Abschnitt atrophiert, degenerieren im proximalen Stumpf einige Axone vollständig; der Großteil der Axone degeneriert retrograd nur bis zum nächsten Ranvier-Schnürring proximal der Läsionsstelle.

Der Zellkörper axotomierter Nervenzellen durchläuft eine Vielzahl von Veränderungen, die als Chromatolyse bezeichnet werden. Dazu gehören ein Anschwellen des Zellkörpers, eine dezentrale Lokalisation des Zellkerns und das

Auflösen der Nissl-Substanz (DIETZMANN, 1990; FU & GORDON, 1997; GRAFSTEIN, 1983; STOLL & MULLER, 1999).

Des Weiteren bilden der distale und proximale Stumpf durch die Produktion von Wachstumsfaktoren wie z.B. Insulin like growth factor-1/2 (IGF-1/2), FGF-2 und Nervenwachstumsfaktor (NGF) ein regenerationsförderndes Milieu (FU & GORDON, 1997; FUNAKOSHI *et al.*, 1993). Allerdings ist der Abstand zwischen distalem und proximalem Stumpf ein limitierender Faktor, da die im distalen Axon produzierten Wachstumsfaktoren den proximalen Abschnitt nur über eine bestimmte Distanz beeinflussen können (BUNGE, 1993; FU & GORDON, 1997; GRIFFIN *et al.*, 1992; GROTHE *et al.*, 2001; MUMENTHALER *et al.*, 1998; RAIVICH & KREUTZBERG, 1993; STOLL *et al.*, 2002).

An der Läsionsstelle bildet sich am proximalen Stumpf ein Wachstumskolben aus aussprossenden Axonen aus. Für den Erfolg der Regeneration ist wichtig, dass diese Axone den distalen Stumpf erreichen. Das wird dadurch erleichtert, dass die Schwann-Zellen im proximalen Stumpf und vor allem aber auch die Schwann-Zellen im distalen Stumpf, durch den Verlust des axonalen Kontaktes zu einem nicht-myelinisierenden Phänotypen dedifferenzieren, proliferieren und durch lineare Anordnung innerhalb des verbliebenen Neurilemms die so genannten Büngner-Bänder ausbilden, die eine Art Leitschiene-funktion zum Zielorgan haben (STOLL *et al.*, 2002; STOLL & MULLER, 1999; TORIGOE *et al.*, 1996). Die vom proximalen Stumpf aussprossenden Axone werden innerhalb weniger Stunden nach der Nervendurchtrennung in die Läsionszone vorgeschoben. Die Wachstumsrate regenerierender Fasern im N. ischiadicus der adulten Ratte beträgt 2,1 mm/24 h (DIETZMANN, 1990).

Können die aussprossenden Axone des proximalen Stumpfes Kontakt mit den Büngner-Bändern aufnehmen und in sie einwachsen, kommt es meist zur Regeneration des Nerven und zur Wiederherstellung seiner Funktion.

Die axonale Regeneration führt zur Redifferenzierung der Schwann-Zellen im distalen Nervenstumpf. Diese schreitet in einer proximo-distalen Richtung, beginnend von der Stelle der Nervenverletzung fort. In den Schwann-Zellen werden dabei Differenzierungsmarker wie z.B. Cell adhesion molecule (L1), Neural cell adhesion molecule (N-CAM) und der niedrig affine

Nervenzwachstumsfaktorrezeptor (p75^{LN^{GF}R}) wieder herunterreguliert (STOLL & MULLER, 1999). Die Remyelinisierung der regenerierenden Axone wird durch den Kontakt von Axolemm und Schwann-Zelle induziert. Die Bildung von myelinassoziierten Proteinen in den Schwann-Zellen induziert die Spiralisierung der Myelinscheide (FU & GORDON, 1997; KRÄMER & TROTTER, 2004).

Die regenerierten Nervenfasern erlangen allerdings nicht mehr die gleiche Funktionalität wie vor der Läsion. So ist z.B. die Nervenleitgeschwindigkeit nach einer Nervenverletzung aufgrund verkürzter internodaler Abstände zwischen den Ranvier-Schnürringen verringert. Auch die vollständige funktionelle Regeneration der atrophierten Muskulatur bleibt aus (FU & GORDON, 1995).

Gelingt es den proximal auswachsenden Axonen aufgrund einer großen Distanz und somit einer fehlenden Leitschiene nicht, die vom distalen Stumpf ausgehenden Büngner-Bänder zu erreichen, verlieren sie ihre proximo-distale Ausrichtung, wachsen knäuelartig durcheinander und bilden zusammen mit dem entstehenden Narbenbindegewebe ein Narbennurom. Das hat zur Folge, dass die nun nicht mehr innervierten Muskeln atrophieren (FU & GORDON, 1995; MUMENTHALER *et al.*, 1998).

Der Erfolg der Regeneration eines peripheren Nerven ist also in jedem Fall abhängig von der zu überbrückenden Lücke zwischen dem distalen und proximalen Nervenstumpf (BUTI *et al.*, 1996). Die Distanz, bei der es trotz Einsetzen von Silikonröhrchen zu keiner spontanen Regeneration mehr kommt, liegt bei der Ratte zwischen 12 mm und 15 mm und bei der Maus zwischen 6 und 8 mm (BUTI *et al.*, 1996; FRANCELE *et al.*, 1997; LUNDBORG *et al.*, 1982).

In Abb. 2 sind die degenerativen und regenerativen Veränderungen am distalen und proximalen Axonabschnitt schematisch dargestellt.

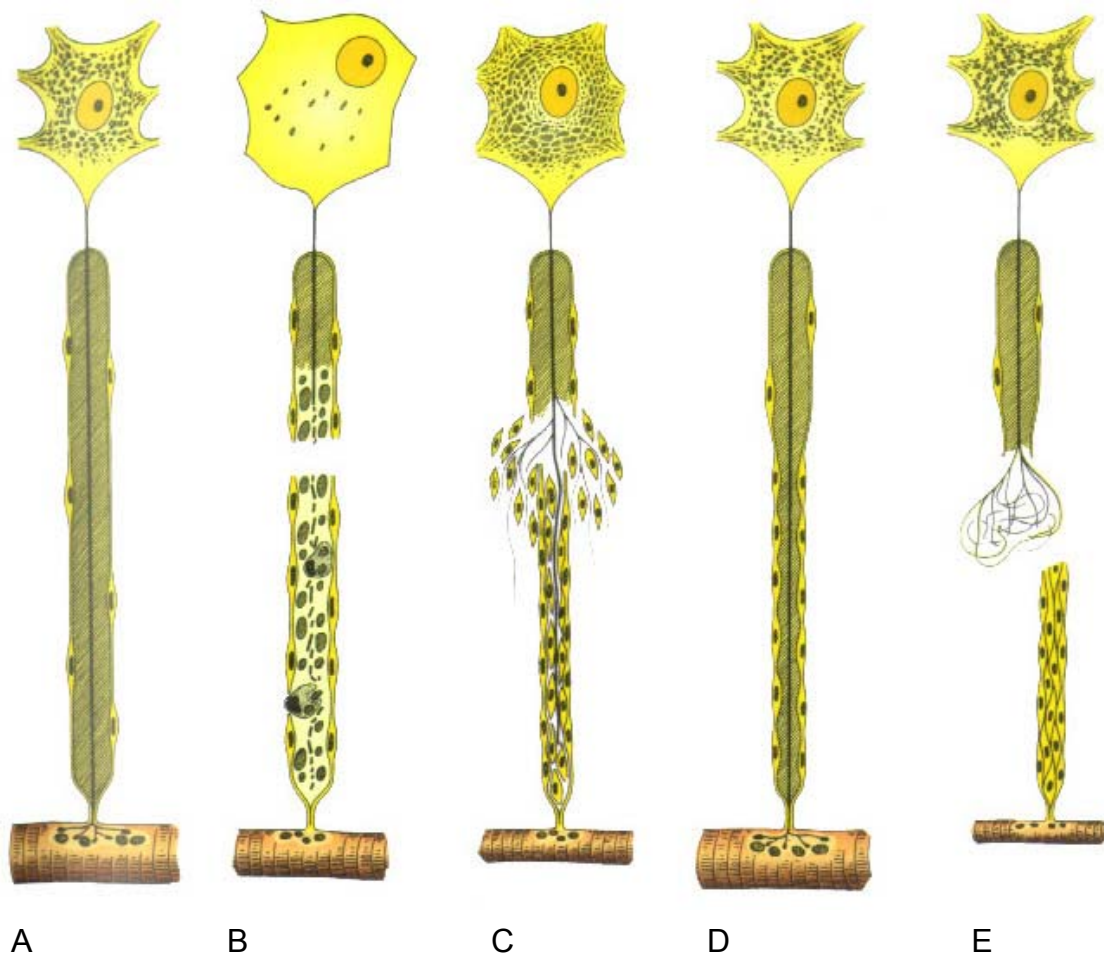


Abb. 2 Schematische Darstellung der degenerativen und regenerativen Veränderungen am distalen und proximalen Axonabschnitt. (A) Normale Nervenfasern mit dem zugehörigen Perikaryon und ihrer Zielzelle, einer Skelettmuskelfaser. (B) Wird eine Nervenfasern verletzt, kommt es im proximalen Axonabschnitt zur dezentralen Lokalisation des Zellkerns und die Nissl-Substanz beginnt sich aufzulösen. Der distale Axonabschnitt und die ihn umgebende Myelinscheide degenerieren. (C) Die Muskelfaser zeigt eine deutliche Atrophie. Die Schwann-Zellen proliferieren und bilden die Bänder, in die das aussprossende Axon einwächst. (D) Diese Skizze zeigt den Zustand nach erfolgreicher Regeneration des Nerven. Die Muskulatur regeneriert ebenfalls, nachdem sie wieder innerviert wurde. (E) Erreichen die auswachsenden Axone nicht die von den Schwann-Zellen ausgebildeten Bänder, kommt es zum unkoordinierten Auswachsen der Axone (JUNQUEIRA *et al.*, 2002).

3. Experimentelle Überbrückungsmöglichkeiten nach einer Nervenläsion

Um nach einer Verletzung eines peripheren Nerven mit hohem Verlust an Nervengewebe eine Neurombildung und somit eine Atrophie der betroffenen Muskeln zu verhindern, kommen in der Klinik verschiedene Verfahren zur Anwendung, die den Regenerationserfolg nach einer Nervenläsion mit Gewebeverlust erhöhen sollen. Um die Lücke zwischen dem proximalen und distalen Axonabschnitten zu überbrücken, ist die Implantation von autologem Nervengewebe die Methode der Wahl (IJKEMA-PAASSEN *et al.*, 2004; NIKKHAH *et al.*, 1997). Der Einsatz autologer Nerventransplantate erfordert allerdings die Verwendung von gesunden Spendernerven und ist somit limitiert. Weitere mögliche autologe Transplantate können aus Venen, Muskelgewebe oder Sehnen gewonnen werden, zeigen aber weniger gute Regenerationserfolge als autologe Nerventransplantate (COUTURIER *et al.*, 2002; MEEK *et al.*, 1999a; ZHANG *et al.*, 2002). Eine Alternative zur autologen Transplantation ist das Einsetzen allogener Nerventransplantate, wobei dies den Einsatz von Immunsuppressiva erfordert, um Abstoßungsreaktionen zu verhindern, was den Regenerationserfolg erneut erheblich mindern kann (EVANS, 2001; NAVARRO *et al.*, 2003). Eine viel versprechende Alternative zu beiden Methoden ist das „Tissue Engineering“. Es bezeichnet die Herstellung eines Gerüsts aus synthetischen und natürlichen Substanzen, das als Leitschiene für einsprossende Axone fungiert und mit regenerationsfördernden Zellen, wie z.B. Schwann-Zellen, Wachstumsfaktoren und extrazellulärer Matrix durchsetzt oder befüllt sein kann (EVANS *et al.*, 2002; FANSA *et al.*, 2003; LUNDBORG, 2004; SCHMIDT & LEACH, 2003).

3.1 Interponatmodelle

Es gibt inzwischen eine große Bandbreite an möglichen Nerveninterponaten, die als Leitschiene für regenerierende Axone dienen können. Man unterscheidet zwischen natürlichen und synthetischen Materialien. Natürliche Materialien

zeichnen sich durch Biokompatibilität, geringe toxische Effekte und eine Migrationsförderung von regenerationsfördernden Zellen aus. Verschiedene natürliche Materialien wie z.B. Kollagen, Laminin, Fibrin, denaturiertes Muskelgewebe oder Venen wurden bisher eingesetzt (ANSSELIN *et al.*, 1997; EVANS, 2001; LUNDBORG, 2004; MEEK *et al.*, 1999a; NOVIKOV *et al.*, 2002; SCHMIDT & LEACH, 2003). Synthetische Materialien sind eine attraktive Alternative zu natürlichen Stoffen, da sie je nach Bedarf in ihrer Form, ihrer Stabilität, ihrem Abbau und ihrer Durchlässigkeit modifiziert werden können (LUNDBORG, 2004; SCHMIDT & LEACH, 2003). Des Weiteren kann man zwischen resorbierbaren und nicht-resorbierbaren Materialien unterscheiden. Gängige resorbierbare Materialien, die zur Herstellung von Interponaten genutzt werden, wie z.B. Polylacticacid (PLA) oder Poly-L-glycolocacid (PLGA), bieten den Vorteil, dass keine weiteren Operationen nötig sind, um das Interponat nach erfolgter Regeneration wieder zu entfernen (AEBISCHER *et al.*, 1989; FINE *et al.*, 2002; GUENARD *et al.*, 1992; NAKAMURA *et al.*, 2004; RODRIGUEZ *et al.*, 1999). Künstliche Stoffe wie z.B. Silikon oder Polyvinylchlorid (PVC), Ethylenvinylacetat (EVA) sind hingegen stabiler als abbaubare Materialien, beeinflussen nicht den Regenerationsprozess und können über einen längeren Zeitraum eingesetzt werden, allerdings bergen sie ein erhöhtes Infektionsrisiko und führen häufig zu chronischen Entzündungen (AEBISCHER *et al.*, 1989; FINE *et al.*, 2002; GUENARD *et al.*, 1992; SCHMIDT & LEACH, 2003; ZHAO *et al.*, 1997). Weiterhin sind für eine erfolgreiche Regeneration physikalische Parameter, wie z.B. der Innendurchmesser und die Wanddicke des Implantates von Bedeutung (BUTI *et al.*, 1996).

3.2 Befüllungsmöglichkeiten der Interponate

Da sowohl Schwann-Zellen und eine mechanische Leitschiene als auch chemische Faktoren, die vom distalen Stumpf freigesetzt werden, bei der Nervenregeneration eine Rolle spielen, werden in experimentellen Studien die

implantierten Interponate mit Zellen oder regenerationsfördernden Substanzen befüllt, beschichtet oder diese Substanzen werden in das Material des Interponat integriert und im Regenerationsprozess vom Interponat freigesetzt. Eine weitere Möglichkeit ist, die Substanzen über osmotische Minipumpen freizusetzen (MUMENTHALER *et al.*, 1998; YOUNG *et al.*, 2001).

Die am häufigsten eingesetzten regenerationsfördernden Substanzen sind Bestandteile der extrazellulären Matrix und neurotrophe Faktoren. Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Laminin, Kollagen und Fibronectin wurden von (CEBALLOS *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2000; MADISON *et al.*, 1985; MATSUMOTO *et al.*, 2000) erfolgreich zur Überbrückung von Nervendefekten genutzt. Neurotrophe Faktoren sind Moleküle, die bei der Entwicklung und Regeneration des Nervensystems eine Rolle spielen. Sie stimulieren die Nervenzelldifferenzierung und sind für das Überleben der Nervenzellen notwendig. Bei der Nervenzelldifferenzierung auf morphologischer Ebene werden verschiedene Vorgänge wie z.B. die Bildung von Axonen, Dendriten und Synapsen stimuliert. Die Differenzierung auf biochemischer Ebene beinhaltet die Bildung spezifischer Neurotransmitter und anderer Neuromediatoren. Zu den neurotrophen Faktoren gehören unter anderem: 1) Neurotrophine (dazu gehören z.B. NGF, Brain derived neurotrophic factor (BDNF), Neurotrophin(NT)-3, NT-4/5); 2) Glia derived neurotrophic factor (GDNF); 3) Ciliary neurotrophic factor (CNTF); 4) Transforming growth factor (TGF); 5) FGF-2; 6) Epidermal growth factor (EGF) und 7) IGF (ALOISI, 2003; MARKUS *et al.*, 2002; MUMENTHALER *et al.*, 1998; SCHMIDT & LEACH, 2003).

In vielen experimentellen Studien konnte nach einer Nervenläsion durch Zugabe von NGF, BDNF, GDNF oder FGF-2 in das Interponat das Überleben der Neurone, das Auswachsen ihrer Axone und so ihre Regenerationsfähigkeit gesteigert werden (DERBY *et al.*, 1993; DONNERER, 2003; MARCOL *et al.*, 2003; OTTO *et al.*, 1987; TERRIS *et al.*, 2001; TOLWANI *et al.*, 2004). So zeigte sich nach Freisetzung von FGF-2 oder GDNF aus dem Interponat eine Regeneration selbst über große Distanzen zwischen dem proximalen und distalen Nervenstumpf (AEBISCHER *et al.*, 1989; FINE *et al.*, 2002). Auch weitere neurotrophe Faktoren wie CNTF, TGF und EGF, die einen Einfluss auf das Überleben von Nervenzellen

oder deren axonales Auswachsen haben, wurden experimentell eingesetzt, um die Regeneration nach Nervenläsionen zu fördern (EVANS, 2001; HO *et al.*, 1998; SCHMIDT & LEACH, 2003).

Eine weitere, viel versprechende Alternative zur Unterstützung der Nervenregeneration bietet die Implantation von Zellen wie z.B. olfaktorischen Hüllzellen (OECs) oder Schwann-Zellen. Schwann-Zellen sind auch unter natürlichen Bedingungen an regenerativen Prozessen beteiligt und produzieren neurotrophe Faktoren, Bestandteile der extrazellulären Matrix und Adhäsionsmoleküle (L1, N-CAM) und tragen so selbst zu einem regenerationsfördernden Milieu bei (ANSSELIN *et al.*, 1997; GUENARD *et al.*, 1992; GULATI *et al.*, 1995; GUNTINAS-LICHIUS *et al.*, 2001; MADISON *et al.*, 1985; NOVIKOV *et al.*, 2002; RODRIGUEZ *et al.*, 2000; RUTKOWSKI *et al.*, 2004; VERDU *et al.*, 1999). Darüber hinaus können diese Zellen genetisch derart modifiziert werden, dass sie regenerationsfördernde Substanzen vermehrt produzieren (TIMMER *et al.*, 2003; TOLWANI *et al.*, 2004).

3.3 Fibroblasten Wachstumsfaktor-2 (FGF-2)

Die Familie der FGFs umfasst zurzeit 23 Mitglieder, wobei das FGF-15 der Maus zu dem FGF-19 des Menschen homolog ist. FGF-Proteine spielen vor allem im Rahmen der Embryonalentwicklung und während der Morphogenese verschiedener Organe eine wichtige Rolle. So werden Mitglieder der FGF-Familie im Lauf der Ontogenese in diversen Gewebetypen wie z.B. Epithel, Muskel-, Binde- und Nervengewebe exprimiert. Des Weiteren spielen sie bei der Wundheilung, Angiogenese und Hämatopoese eine wichtige Rolle (ALOISI, 2003; OKUMURA *et al.*, 1996).

FGFs vermitteln ihre Funktionen über zwei verschiedenen Klassen von Rezeptoren. Zum einen über die hoch-affinen Tyrosin-Kinase-Rezeptoren, von denen zur Zeit vier (FGFR1-FGFR4) bekannt sind, und zum anderen über die weniger spezifischen Heparansulfat-Proteoglycane. Die FGFRs werden von unterschiedlichen Genen kodiert und weisen mit Ausnahme von FGFR1

verschiedene Splice-Varianten auf, die für unterschiedliche Bindungsaffinitäten der verschiedenen FGFs an die jeweiligen Rezeptoren verantwortlich sind (DONO, 2003; ORNITZ & ITOH, 2001; ORNITZ *et al.*, 1996).

FGF-2 ist in verschiedenen Gewebetypen wie z.B. im Nervensystem, in den Nieren, im Herzen, in der Lunge und den Extremitäten lokalisiert und zeigt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen (ORNITZ & ITOH, 2001).

Im PNS werden FGF-2 und seine Rezeptoren in den Perikarien der Spinalganglienneurone und deren benachbarten Satelliten-Zellen (FGF-2 und FGFR1-4) sowie in differenzierten Schwann-Zellen im peripheren Nerven (FGF-2 und FGFR1-3) exprimiert. Nach einer Verletzung im PNS wird diese Expression besonders in den Nervenstümpfen hochreguliert. Außerdem kommen als weitere Syntheseorte dedifferenzierte Schwann-Zellen und einwandernde Makrophagen hinzu. Für FGF-2 wurden auto- und/oder parakrine Wirkmechanismen diskutiert (GROTHE & NIKKHAH, 2001).

Die vermehrte Expression von FGF-2 und den FGFRs von Schwann-Zellen und Makrophagen nach Nervenläsion deutet auf eine spezielle Funktion von FGF-2 im Rahmen der Regeneration hin (DONO, 2003; GROTHE *et al.*, 2001; GROTHE *et al.*, 1997; GROTHE & NIKKHAH, 2001). Außerdem ist aus der Literatur bekannt, dass FGF-2 *in vitro* die Expression des Myelinproteins P0 unterdrückt und die Proliferation von Schwann-Zellen steigert (DAVIS & STROOBANT, 1990; MORGAN *et al.*, 1994). Dies deutet darauf hin, dass FGF-2 im frühen Regenerationsverlauf die Myelinisierung unterdrückt und die Proliferation der Schwann-Zellen steigert, damit diese die als Leitschiene fungierenden Büngner-Bänder ausbilden können (GROTHE & NIKKHAH, 2001; JUNGnickel *et al.*, 2004; MORGAN *et al.*, 1994; MULLER-OSTERMEYER *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2003).

FGF-2 wird in drei unterschiedlichen Isoformen exprimiert. Man unterscheidet zwischen der niedermolekularen Isoform (18-kDa-FGF-2), die kommerziell erhältlich ist, und den höhermolekularen Isoformen (HMW-FGF-2). Die drei Isoformen sind unterschiedliche Translationsprodukte derselben mRNA-Spezies (CLAUS *et al.*, 2003; FLORKIEWICZ *et al.*, 1991; FLORKIEWICZ & SOMMER, 1989).

Zurückliegende Studien konnten zeigen, dass die verschiedenen FGF-2-Isoformen während der Entwicklung und nach Verletzungen im PNS unterschiedlich reguliert werden (GROTHE & NIKKHAH, 2001). So konnte von MEISINGER & GROTHE (1997) gezeigt werden, dass in der Ratte nach einer Quetschung des N. ischiadicus die 18-kDa-FGF-2 und die HMW-FGF-2-Isoformen in den DRGs und im peripheren Nervengewebe unterschiedlich stark hochreguliert werden. In den DRGs wurde eine sehr viel stärkere Expression von HMW-FGF-2 im Vergleich zu 18-kDa-FGF-2 nachgewiesen. Des Weiteren konnte eine zeitlich versetzte Expression von niedermolekularem 18-kDa-FGF-2 und HMW-FGF-2 bestimmt werden. 18-kDa-FGF-2 wird innerhalb von 5 h nach einer Nervenverletzung verstärkt exprimiert, während die Biosynthese von HMW-FGF-2 erst nach 7 Tagen erhöht ist (GROTHE *et al.*, 2000; MEISINGER & GROTHE, 1997). Studien bezüglich der zellulären Verteilung von FGF-2 in Schwann-Zellen zeigten eine unterschiedliche Lokalisation von 18-kDa-FGF-2 und HMW-FGF-2. So wurde 18-kDa-FGF-2 in den Nukleoli, im Nukleoplasma und den Cajal-Körperchen nachgewiesen, während HMW-FGF-2 eine punktuelle Verteilung am Rand der Nukleoli und im Nukleoplasma erkennen ließ (CLAUS *et al.*, 2003). Unterschiedliche Effekte von 18-kDa-FGF-2 und HMW-FGF-2 sind aus anderen Systemen bekannt. In einem Ratten-Modell für Morbus Parkinson konnte durch die Implantation von HMW-FGF-2-überexprimierenden Schwann-Zellen im Vergleich zur Implantation von 18-kDa-überexprimierenden Schwann-Zellen eine bessere Reinnervation und Überlebensrate von ko-transplantierten dopaminergen Neuronen festgestellt werden (TIMMER *et al.*, 2004). Die genannten unterschiedlichen Effekte der Isoformen deuten auf verschiedene spezifische biologische Funktionen der jeweiligen Isoformen im ZNS hin, wurden allerdings noch nicht im PNS untersucht. Neben FGF-2 sind am Regenerationsprozess sicherlich noch andere Faktoren beteiligt, wie z.B. GDNF, CNTF oder Interleukin-6 (IL-6), von denen gezeigt wurde, dass sie sich positiv auf die Nervenregeneration auswirken, was für eine gemeinsame Funktion und Interaktion von FGF-2 mit diesen Faktoren spricht (FINE *et al.*, 2002; GROTHE *et al.*, 2000; HO *et al.*, 1998).

4. Wissenschaftliche Fragestellung

Aufgrund der zur Zeit vorliegenden wissenschaftlichen Erkenntnisse im Rahmen der peripheren Nervenregeneration nach einer Nervenverletzung mit großem Substanzverlust und der immer noch unzureichenden Behandlungsmöglichkeiten, war es das Ziel dieser Arbeit, die Effekte einer Überexpression von FGF-2-Isoformen *in vivo* auf die funktionelle und axonale Nervenregeneration nach großem Substanzverlust zu untersuchen.

Da aus der Literatur bekannt ist, dass Schwann-Zellen und FGF-2 eine wichtige Rolle im Rahmen der peripheren Nervenregeneration spielen, sollten diese beiden Faktoren, eingebracht in ein als Leitschiene fungierendes Silikonröhrchen, kombiniert werden.

Da weiterhin vermutet wird, dass es Unterschiede zwischen den verschiedenen Isoformen bezüglich ihrer Funktion im PNS gibt und bisherige Arbeiten mit der kommerziell erhältlichen 18-kDa-Isoform und einem anderen Versuchsdesign durchgeführt wurden (AEBISCHER *et al.*, 1989; FUJIMOTO *et al.*, 1997; IDE *et al.*, 1998; OTTO *et al.*, 1987; WANG *et al.*, 2003), wurde in einer diesem Projekt vorangegangenen Arbeit der Einfluss von Schwann-Zellen, die HMW-FGF-2 überexprimierten, untersucht. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass HMW-FGF-2 im etablierten Tier-Modell des durchtrennten N. ischiadicus der adulten Ratte über einen Beobachtungszeitraum von 4 Wochen die Nervenregeneration über weite Distanzen steigert (TIMMER *et al.*, 2003).

Daher sollte in dieser Arbeit nun weiterhin untersucht werden, inwieweit es Unterschiede zwischen der 18-kDa- und der HMW-Isoformen bzgl. ihrer regenerationsfördernden Eigenschaften gibt.

In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Silikonröhrchen mit genetisch veränderten Schwann-Zellen befüllt, die entweder die 18-kDa-FGF-2-Isoform oder die HMW-FGF-2-Isoformen überexprimierten. Der Beobachtungszeitraum betrug 3 und 6 Monate, um auch die Langzeiteffekte der Isoformen zu untersuchen.

Folgendes experimentelles Versuchsdesign wurde gewählt: Aus den Nervi (Nn.) ischiadici neonataler Ratten wurden Schwann-Zellen gewonnen, aufgereinigt und genetisch derart modifiziert, dass sie entweder 18-kDa-FGF-2 oder HMW-FGF-2 überexprimierten. Diese Zellen wurden in einem Silikonröhrchen adulten Ratten zwischen den proximalen und distalen Nervenstumpf des durchtrennten N. ischiadicus implantiert. Die Lücke zwischen den Stümpfen betrug 15 mm. Die Versuchsdauer betrug 3 bzw. 6 Monate.

Folgende Fragestellungen sollten in der vorliegenden Arbeit geklärt werden:

1. Kann die Nervenregeneration nach Durchtrennung des N. ischiadicus und einem großen Verlust an Nervengewebe durch die Implantation FGF-2-überexprimierender Schwann-Zellen im Vergleich zu physiologischen Schwann-Zellen, transfizierten Kontroll-Schwann-Zellen oder nur mit extrazellulärer Matrix gefüllten Implantaten gesteigert werden?
2. Gibt es zwischen der 18-kDa-Isoform und den HMW-Isoformen Unterschiede bzgl. der Qualität und Quantität der axonalen Regeneration?
3. Wie ist das Regenerationsverhalten der genetisch veränderten Schwann-Zellen nach 3 und 6 Monaten? Gibt es temporär unterschiedliche Effekte im Regenerationsverlauf oder zwischen den Isoformen?

II. Material und Methoden

1. Verwendete Chemikalien, Geräte und Computerprogramme

1.1 Chemikalien und Lösungen

Implantation / Explantation / Neuronenmarkierung

- Chloralhydrat (Fluka, Neu-Ulm)
- Natrium-Chlorid (NaCl) 0,9% (Braun, Melsungen)
- Kohlendioxid (CO₂) (Linde AG)
- retrograd transportierter Marker für Neuronen DiI' (1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin perchlorate), (Molecular Probes, Niederlande)
- Paraformaldehyd (PFA) (Fluka, Neu-Ulm)
- Phosphatgepufferte Salzlösung, 0,1 M, pH 7,4 (PBS) (Biochrom KG)
- Matrigel (Sigma, München)

Gewebeaufarbeitung / Fixierung / Färbung / Einbettung

- 4 % bzw. 8 % PFA in PBS gelöst
- Glutaraldehyd 25 % (Sigma, Taufkirchen).
- Cacodylsäure Natriumsalz Trihydrat (Merck, Darmstadt)
- D(+)-Saccharose reinst (Riedel de Haën, Seelze)
- TissueTek (Sakura Tinetek , Niederlande)
- Osmiumtetroxid 4 % (Polyscience Inc., Warrington, USA)
- Kaliumdichromat 1 % (Merck, Darmstadt)
- Hämatoxylin (Roth, Karlsruhe) 0,5 % in 25 % Ethanol gereift
- Ethanol 25 %, 50 %, 75 %, 90 %, 100 % (J.T. Baker)
- Toluol (Merck, Darmstadt)
- Glycidether 100 (früher Epon 812) (Serva, Heidelberg)
- Dodecenylsuccinic acid anhydride (DDSA) (Serva, Heidelberg)
- Methylenacid anhydride (MNA) (Serva, Heidelberg)
- 2,4,6-tris(dimethyl-aminomethyl)phenol DMP 30 (Serva, Heidelberg)
- Toluidinblau (Merck, Darmstadt)
- Eukitt (Riedel de Haën, Seelze)

Elektronenmikroskopie

- Grids / Cu(Kupfer)mesh 200 (SCI Science Services, München)
- Formva-Lösung (Plano, Wetzlar)
- Uranylacetat (Merck, Darmstadt)
- Reynolds-Lösung/Blei-II-nitrat (Merck, Darmstadt)
- Chloroform (Baker, Niederlande)

1.2 Geräte

- OP-Mikroskop (OPMI, Zeis, Oberkochen)
- Mikrotom (Ultramikrotom System 2128 Ultratom®, LK Bromma)
- Knifemaker (Reichert-Jung)
- Heiztisch (Jürgens)
- Kamera: Color View 12 (Soft Imaging System)
- Epi-Fluoreszenz-Mikroskop Olympus BX60
- Cryostat CM3050 (Leica, Nussloch)
- Elektronenmikroskop EM 9 2S (Zeis, Oberkochen)
- Trockenschrank (Memmert)
- Elektronische Stimulationseinheit (Medtronic Functional Diagnostics A/S, Skovlunde, Dänemark)
- Elektromyograph zur klinischen Anwendung (Medtronic Functional Diagnostics A/S, Skovlunde, Dänemark)
- Notebook

1.3 Computerprogramme

- Microsoft Excel XP
- Microsoft Word XP
- Adobe Photoshop 6.0
- AnalySIS Pro® 3.1 und 3.2 (Soft Imaging System GmbH, Münster, Deutschland)
- StatView 5.0
- Footprint 1.22 (Prof. K. Klapdor , Institut für Neurobiologie, Universität Köln)
- Keypoint® (Medtronic Functional Diagnostics A/S, Skovlunde, Dänemark)

1.4 Sonstige Materialien

- Rivanol 0,1 % (Riedel de Haën, Seelze)
- Altosol (EuoVet, WDT, Garbsen)
- Leovet Anti Bite (Reitsport Biro, Renningen)
- Bepanthen Augen/Nasensalbe (Hoffmann- La Roche, Greuzach-Wyhlen)
- Stempelkissen (Pelikan, Hannover)
- Stempelfarbe rot/blau ohne Öl (Pelikan, Hannover)
- Tapete (Hagebaumarkt, Hannover)
- Corbitbalsam (Hecht, Kiel)
- Objektträger (Menzel, Braunschweig)
- Deckgläser (Menzel, Braunschweig)
- Glasstreifen für Glasmesser (Leica, Nussloch)
- Diamantmesser: Diatome MX2092 (Diatome, Schweiz)
- Inzisionsfolie (Opraflex®, Lohmann GmbH, Neuwied)
- Nahtmaterial (9/0 Ethilon®II, Ethicon; 4/0 Ethilon®II, Ethicon, 3/0 Dexon®, B. Braun-Dexon)
- Skalpell (No. 21, Medizin AG, Köln)
- Silikonröhrchen (18 mm lang, Durchmesser 1,5 mm, Wandstärke 0,4 mm) (VWR International, Hannover)
- OP-Besteck:
 - Chirurgische Pinzette (No. 08-231-130, Allgaier Instrumente GmbH Frittlingen)
 - Uhrmacher-Pinzette (Dumont, No. 5, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg)
 - Metzenbaum-Schere (Fine Science Tools GmbH, Heidelberg)
 - Chirurgische Schere (No. 04-124-145, Allgaier Instrumente GmbH, Frittlingen)
 - Vannas-Mikroschere (No. 15003-08, Fine Science Tools GmbH, Heidelberg)

2. Versuchstiere und Haltung

Für die Versuche wurden insgesamt 96 Ratten (*Rattus norvegicus*) des Stammes Sprague-Dawley im Alter von ca. 8 Wochen verwendet. Die Tiere stammten teilweise aus der Zucht des Zentralen Tierlabors (ZTL) der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) oder wurden von der Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld bezogen. Die Tiere wurden im ZTL der MHH unter Standardlaborbedingungen (Raumtemperatur $22 \pm 2^\circ\text{C}$, Luftfeuchtigkeit $55 \pm 5\%$, Licht/Dunkel-Zyklus 12 h :12 h) zu zweit oder zu dritt auf Standardeinstreu (Altromin, Altrogge, Lage) in Makrolonkäfigen Typ(III) gehalten. Futter (Altromin Standardfutter für Ratten und Mäuse, Altrogge, Lage) und Wasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die durchgeführten Tierversuche erfolgten mit Genehmigung der Bezirksregierung Hannover (Aktenzeichen 509i-42502-99/221) und in Übereinstimmung mit den Richtlinien für Tierversuche nach den Auflagen der Europäischen Gemeinschaft.

2.1 Versuchsdesign

Die Versuchstiere wurden in eine 3- und eine 6-Monats-Gruppe eingeteilt. Innerhalb der zwei Tier-Gruppen erhielten die Tiere nach Durchtrennung des linken N. ischiadicus als Nervenimplantat Silikonröhrchen, die unterschiedlich befüllt waren: mit Matrigel (**Matrigel**, 3-Monats-Gruppe: n = 10), mit jeweils in Matrigel resuspendierten neonatalen Schwann-Zellen (**SZneo**, 3-Monats-Gruppe: n = 13; 6-Monats-Gruppe: n = 9), neonatalen Schwann-Zellen, die genetisch so modifiziert waren, dass sie die 18-kDa-FGF-2-Isoform (**18-kDa**, 3-Monats-Gruppe: n = 13; 6-Monats-Gruppe: n = 9) oder die HMW-FGF-2-Isoformen (**HMW**, 3-Monats-Gruppe: n = 11; 6-Monats-Gruppe: n = 9) überexprimierten oder neonatalen Schwann-Zellen, die mit einem leeren Vektor (**KV**, 3-Monats-Gruppe: n = 13; 6-Monats-Gruppe: n = 9) transfiziert worden waren.

Während der 3-Monats-Studie wurde die funktionelle motorische Regeneration anhand von Laufmusteranalysen überprüft und im Anschluss das Implantat morphometrisch untersucht.

Bei der 6-Monats-Gruppe wurde zusätzlich die sensorische Regeneration mittels eines Verhaltenstests (Withdrawal-Test) überprüft und die Qualität der an der Regeneration beteiligten Neurone anhand eines retrograden Neuronenmarkers (DiI) beurteilt. Weiterhin wurden elektrophysiologische Messungen durchgeführt. Eine Übersicht des Versuchsdesigns und der ausgewerteten Parameter ist im Anhang in Abb. 24 und Tab. 1 als Übersicht dargestellt.

3. Zellkulturtechnik

Die physiologischen neonatalen Schwann-Zellen sowie die transfizierten Schwann-Zellen, die den Tieren im Silikonröhrchen implantiert wurden, wurden mir freundlicherweise von Dr. Kirsten Haastert überlassen.

Die Zellen wurden nach dem im Labor etablierten Protokoll (HAASTERT *et al.*, 2005; TIMMER *et al.*, 2003) gewonnen. Es handelte sich um Schwann-Zellen aus den Nn. ischiadici neonataler Ratten.

Die Reinheit der Kulturen wurde immunocytochemisch mit Antikörpern gegen den Schwann-Zell-Marker S100 ermittelt und betrug ca. 99 %. Die Transfektion der Zellen erfolgte mit Metafectene™ (Biontex). Die DNA zur Produktion der FGF-2-Isoformen wurde in das Plasmid pCineo kloniert. Es entstanden die Plasmide pCineo-18-kDa-FGF-2 (MULLER-OSTERMEYER *et al.*, 2001) und pCineo-21/23-kDa-FGF-2 (Die Plasmide wurden uns freundlicherweise von Dr. Peter Claus zur Verfügung gestellt). Die Plasmide kodierten zudem für eine Genitacin-Resistenz, hierüber konnten die transfizierten Zellen selektiert werden. Die erfolgreiche Überexpression der FGF-2-Isoformen nach Transfektion wurde im Verlauf der Selektion und Expansion der Zellen und direkt vor der Transplantation im Western-Blot überprüft.

Nach sukzessivem Serumentzug und Kultivierung in serumfreiem Medium, wurden die Zellen direkt vor der Implantation in wachstumsfaktorreduziertem Matrigel (v/v, 70/30) resuspendiert und, nachdem der proximale Stumpf in das

Silikonröhrchen eingebracht und befestigt wurde, mit einer Pipette in das Silikonröhrchen gefüllt (Endkonzentration 114×10^6 Zellen / ml).

4. Operationstechnik / Implantation

Die operativen Eingriffe wurden von Frau Dr. Haastert durchgeführt. Die Operationsvorbereitung, Narkose und Operationsnachsorge der Tiere fielen in meinen Aufgabenbereich.

Während aller operativen Eingriffe wurden die Tiere auf einem Wärmekissen gelagert und die Augen waren zum Schutz vor Austrocknung mit Panthenol Augensalbe bedeckt. Die Eingriffe wurden mit Hilfe eines Operationsmikroskops durchgeführt.

Zur Implantation der Silikonröhrchen wurden die Tiere durch Einleitung von CO₂ in den Käfig kurzzeitig betäubt und zur Narkose Chloralhydrat (370 mg/kg Körpergewicht) intraperitoneal appliziert. Bei der narkotisierten Ratte wurde die linke Hinterextremität rasiert und mit 70%igem Alkohol desinfiziert. Das Operationsfeld wurde mit steriler Inzisionsfolie abgeklebt. Die Ratte wurde in Bauchlage fixiert und der linke Oberschenkel hochgelagert. Mit einem Skalpell wurde die Haut parallel des Femurs auf einer Länge von ca. 2-3 cm durchtrennt. Die Muskelbäuche wurden stumpf mit einer Metzenbaum-Schere und einer chirurgischen Pinzette getrennt und der N. ischiadicus in der Tiefe freigelegt. Mittels einer VANNAS-Mikroschere und Uhrmacherpinzetten wurde der Nerv vom umliegenden Bindegewebe befreit und oberhalb der Bifurkation in den N. tibialis und N. peroneus (fibularis) durchtrennt.

Der proximale Nervenstumpf wurde durch Einziehen eines epineuralen Knopfheftes 2 mm in das Silikonröhrchen eingebracht und befestigt (9/0, Ethilon). Anschließend wurden die Röhrchen entsprechend befüllt. Das eingebrachte Volumen entsprach der zur Verfügung stehenden Zellzahl (Endkonzentration 114×10^6 Zellen / ml) und lag bei 30-60 µl pro Implantat. Die implantierte Zellzahl pro Silikonröhrchen betrug: 3-Monats-Gruppe: SZneo = 4.875.000 Zellen, 18-kDa = 4.450400 Zellen, KV = 3.640.000 Zellen, HMW =

2.576.000 Zellen; 6-Monats-Gruppe: SZneo = 2.465.000 Zellen, 18-kDa = 3.432.600 Zellen, KV = 2.468.421 Zellen, HMW = 2.432.000 Zellen.

Der distale Nervenstumpf wurde ebenfalls mittels eines Knopfheftes 1 mm in das Silikonröhrchen eingebracht und befestigt (Abb. 3). Anschließend wurde die Muskulatur des Oberschenkels mit resorbierbarem Faden (3/0, Dexon) adaptiert und die Haut mit nicht-resorbierbarem Faden (4/0, Ethilon) durch Einzelhefte, in Matratzennaht, verschlossen. Die Tiere wurden in der Aufwachphase warm gehalten und Harn- und Kotabsatz postoperativ kontrolliert. Um Autotomieverhalten (Autophagie der Gliedmassen der läsionierten Hinterpfote) zu unterbinden, wurden den Ratten alle 2 Tage die Füße mit Altosol-Spray oder Leovet Anti Bite-Spray eingesprüht.

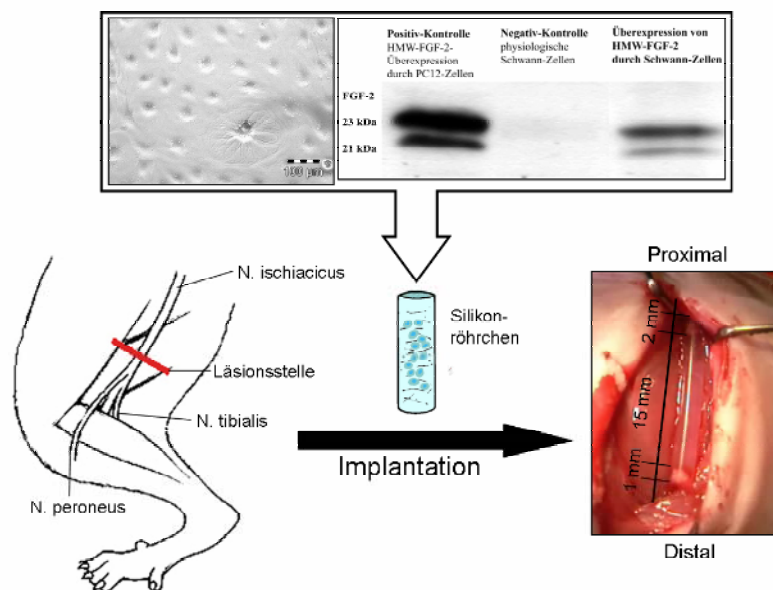


Abb. 3 Schematische Darstellung der Implantationstechnik. Die Schwann-Zellen wurden vor ihrer Implantation im Western-Blot bzgl. ihrer Überexpression der unterschiedlichen Isoformen überprüft. Der proximale Nervenstumpf des linken N. ischiadicus der Ratte wurde 2 mm in ein 18 mm langes Silikonröhrchen eingebracht und mit Knopfheften befestigt. Anschließend wurden die jeweiligen im Matrigel resuspendierten Schwann-Zellen in das Röhrchen gefüllt und der distale Stumpf 1 mm in das Röhrchen eingebracht und befestigt (Schema modifiziert nach BAIN *et al.* (1989), Abbildung der Schwann-Zellen und des Western-Blots wurden freundlicherweise von Frau Dr. Haastert zur Verfügung gestellt).

5. Analyse der funktionellen Regeneration

Um die motorische und sensorische Regeneration des N. ischiadicus zu bestimmen, wurden eine Analyse der Hinterpfotenabdrücke und eine Untersuchung der Temperatursensibilität durchgeführt. Anhand der Abdrücke der Hinterpfoten wurde der Sciatic Function Index (SFI) berechnet. Zur Überprüfung des Reaktionsvermögens auf einen sensorischen Reiz wurde das reflektorische Zurückziehen der Hinterpfoten aus einem heißen Wasserbad beobachtet (Withdrawal-Test).

5.1 Motorische Regeneration

Eine nicht-invasive Methode zur Bestimmung des Regenerationserfolges motorischer Funktionen nach einer Läsion des N. ischiadicus ist der 1982 von DE MEDINACELI *et al.* (1982) entwickelte und von BAIN *et al.* (1989) modifizierte Sciatic Function Index (SFI) (BAIN *et al.*, 1989; DE MEDINACELI *et al.*, 1982; EVANS *et al.*, 2002).

Der SFI ist ein Zahlenwert, der die Funktionstüchtigkeit des N. ischiadicus quantitativ beschreibt. Er errechnet sich aus der Differenz verschiedener, gemessener physiologischer Parameter der beiden hinteren Extremitäten (BAIN *et al.*, 1989; VAREJAO *et al.*, 2001). Anhand von Fußabdrücken wird jeweils für die rechte und die linke hintere Extremität der Abstand zwischen der 1. und 5. Zehe (Toe Spread, TS), der Abstand zwischen der 2. und 4. Zehe (Intermediate Toe Spread, ITS) und der Abstand zwischen der Ferse und 3. Zehe (Print Length, PL) gemessen (Abb. 4A) (MEEK M.F. *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Die erhaltenen Daten werden in die folgende Formel eingesetzt und darüber der SFI berechnet:

$$\begin{aligned} \text{SFI} = & - 38,3 \quad \times \quad (\text{PL} - \text{NPL}) / \text{NPL} \\ & + 109,5 \quad \times \quad (\text{ETS} - \text{NTS}) / \text{NTS} \\ & + 13,3 \quad \times \quad (\text{EITS} - \text{NITS}) / \text{NITS} \\ & - 8,8 \end{aligned}$$

(EPL/NPL= Fußabdrucklänge läsionierter/nicht-läsionierter Fuß, ETS/NTS= Zehenspreizen zw. 1. und 5. Zehe am läsionierten/nicht-läsionierten Fuß, EITS/NITS= Zehenspreizen zw. 2. und 4. Zehe am läsionierten/nicht-läsionierten Fuß) (BAIN *et al.*, 1989)

Nach einer Läsion des N. ischiadicus kommt es durch die fehlende Innervation des Musculus (M.) biceps femoris sowie der Muskulatur des Unterschenkels und Fußes (M. gastrocnemius, M. soleus, M. tibialis anterior, M. extensor digitorum longus, M. extensor hallucis longus, M. fibularis tertius, M. fibularis longus, M. fibularis brevis) zu einer veränderten Fußhaltung und somit zu einem veränderten Laufmuster. Die Tiere können die Zehen nicht mehr spreizen und setzen beim Laufen aufgrund einer stärkeren Beugung des Fußgelenkes den ganzen Fuß auf (BAIN *et al.*, 1989; HARE *et al.*, 1993) (Abb. 4D,E).

Die sich daraus ergebenden Veränderungen von TS, ITS und PL führen zu einer Verminderung des SFI. Im Idealfall ist der SFI ca. 0, bei starker Beeinträchtigung des N. ischiadicus ist der SFI = -100 (DIJKSTRA *et al.*, 2000; MEEK M. F. *et al.*, 1997; MEEK *et al.*, 1999b; PAPAKONSTANTINOOU *et al.*, 2002).

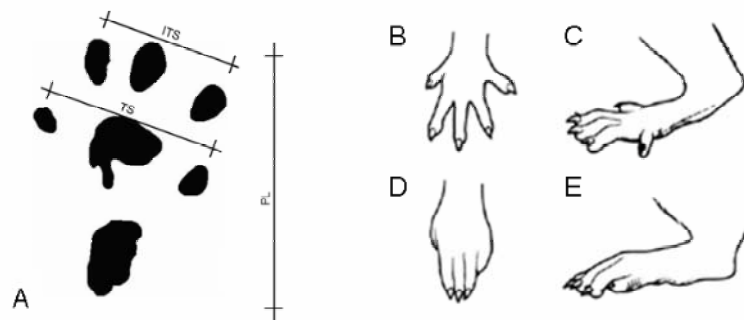


Abb. 4 A) Fußabdruck der rechten, hinteren Extremität einer Ratte, Zehenspreizen und Fußhaltung einer gesunden Ratte (B, C) und veränderte Haltung von Zehen und Fuß nach einer Läsion des N. ischiadicus (D, E) (BAIN *et al.*, 1989). TS = Toe spread, ITS = Intermediate toe spread, PL = Print length

Zur Abnahme der Hinterpfotenabdrücke der Ratten, wurde nach Literaturangaben (KLAPDOR *et al.*, 1997; OZMEN *et al.*, 2002) eine spezielle Laufanlage aus Holz konstruiert (Abb. 5). Die Laufbahn bestand aus einer 1 m langen und 14 cm breiten Laufstrecke mit einer Steigung von 20°. Auf der Laufstrecke wurde eine handelsübliche Regenrinne (Länge 1 m, Breite 10 cm) befestigt, so dass diese einen Tunnel bildete. Die Laufstrecke wurde mit herkömmlicher Raufasertapete ausgelegt. Zum Anfärben der Füße wurden zwei unterschiedlich farbige Stempelkissen verwendet (OZMEN *et al.*, 2002).

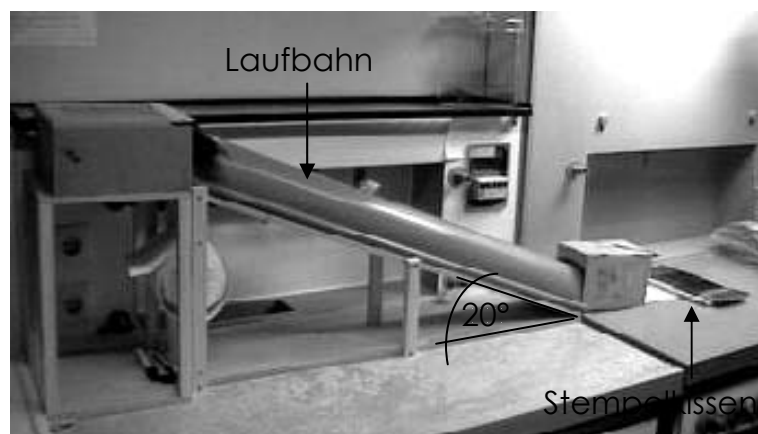


Abb. 5 Laufbahn zur Abnahme der Fußabdrücke. Die Tiere wurden mit den Hinterfüßen auf den Stempelkissen platziert und konnten anschließend die Laufbahn passieren.

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere über mehrere Tage gehändelt und an die Laufanlage gewöhnt. Zur Abnahme der Pfotenabdrücke wurden die Tiere mit einer Hand im Schulter-Brustbereich fixiert und die Hinterpfoten mit leichtem Druck auf dem Stempelkissen platziert. Anschließend wurden die Tiere losgelassen und konnten die Laufbahn passieren.

Die erhaltenen Pfotenabdrücke wurden mit einer Auflösung von 75 dpi eingescannt und als monochrome Bitmap-Dateien gespeichert. Mit einem speziellen Computerprogramm von Frau Dr. K. Klapdor und Kollegen (1997) wurden der TS, der ITS und die PL von beiden Hinterpfoten vermessen, die erhaltenen Werte gespeichert, in Microsoft Excel importiert und der SFI nach oben genannter Formel berechnet.

Bei den Tieren der 3-Monats-Gruppe wurden die Pfotenabdrücke vor der Implantation, nach 6 Wochen und nach 3 Monaten untersucht. Bei den Ratten der 6-Monats-Gruppe erfolgte die Analyse der Fußabdrücke vor der Implantation, nach 3, 4 und 6 Monaten.

5.2 Sensorische Regeneration

Die Regeneration der sensorischen Nervenfasern wurde anhand des reflektorischen Zurückziehens der Hinterpfoten nach einem Temperaturreiz überprüft. Dazu wurden erst die rechte und anschließend die linke hintere Pfote in ein Warmwasserbad (50°C) gedippt und die Reaktionszeit bis zum Zurückziehen der Pfote mit einer Stoppuhr gemessen. Erfolgte die Reaktion nicht innerhalb von 5 Sekunden, wurde die Pfote aus dem Wasser entfernt, um Gewebeschäden zu vermeiden. Die Latenzzeit wurde in diesem Fall mit 5 Sekunden angegeben. Die Untersuchung der Regeneration der Temperatursensibilität wurde vor der Operation und nach 1, 4, 8 und 12 Wochen mit der 6-Monats-Gruppe durchgeführt.

6. Qualitative Analyse des Regenerationserfolges

6.1 Elektrophysiologie

Um die Regeneration der motorischen Nervenfasern und die Reinnervation der nachgeschalteten Muskeln zu analysieren, wurden bei der 6-Monats-Gruppe zusätzlich zur Laufmusteranalyse elektrophysiologische Messungen durchgeführt. Diese Messungen wurden mit freundlicher Unterstützung von Herrn Dr. Martin Fischer durchgeführt.

Die Tiere wurden wie oben beschrieben narkotisiert (CO₂, Chloralhydrat 370 mg/kg Körpergewicht), der rechte und linke Oberschenkel rasiert, desinfiziert und das OP-Feld mit Inzisionsfolie abgeklebt. Zuerst wurde der linke N. ischiadicus mit dem implantierten Silikonröhrchen freigelegt. Befand sich im Röhrchen ein regeneriertes Gewebekabel, wurden der Nerv und das Implantat mit einer Mikroschere und Uhrmacherpinzetten vom umgebenden Bindegewebe befreit und mit kleinen Latextüchern gegen das umliegende Gewebe abgeschirmt. Eine Haken-Stimulationselektrode wurde erst proximal und dann distal des Röhrchens und die Nadel-Ableitelektroden am M. gastrocnemius und der Achillessehne platziert (Tendon-Belly-Methode zur bipolaren Ableitung). Es wurden mittels einer Software-gesteuerten Stimulationseinheit Einzelreize mit einer Bandbreite von 20-3000 Hz, einer Intensität von 0-10 mA und einer Dauer von 0,1 ms ausgelöst. Ausgelöste Muskelaktionspotentiale (MAPs) wurden mit einem Elektromyographen für klinische Anwendungen, der an ein Notebook angeschlossen war, aufgezeichnet. Es wurden die Latenzzeiten, die daraus resultierenden Nervenleitgeschwindigkeiten und die Amplituden der MAPs berechnet und gespeichert. Danach wurde der N. ischiadicus der rechten Hinterpfote freigelegt, als Kontrolle gemessen und anschließend die Wunde durch eine Muskel- und Hautnaht verschlossen. Die linke Hinterextremität wurde im Anschluss an die elektrophysiologischen Messungen mit dem retrograd transportierten Neuronenmarker Dil markiert.

6.2 Neuronenmarker Dil

6.2.1 Applikation von Dil zur Markierung der in den regenerierten Nerven projizierenden Neurone

Da es sich beim N. ischiadicus um einen gemischt sensorisch-motorischen Nerven handelt, sollte untersucht werden, ob das Regenerationsverhalten motorischer und sensorischer Neurone in den verschiedenen experimentellen Gruppen unterschiedlich beeinflusst wird. Die Perikaryen der Motoneurone sind im Vorderhorn des ventralen Rückenmarks lokalisiert. Die Zellkerne der sensorischen Fasern befinden sich in den DRGs. Diese Untersuchung wurde an der 6-Monats-Gruppe durchgeführt.

Befand sich im Implantat ein regeneriertes Gewebekabel, wurden die in Punkt 6.1 beschriebenen elektrophysiologischen Tests durchgeführt. Anschließend wurde auf der linken Seite der N. ischiadicus mit einer Mikroschere distal des Implantates durchtrennt und mit einer Uhrmacher-Pinzette die Kristalle des lipophilen retrograden Fluoreszenzfarbstoffs Dil auf den gesamten Nervenquerschnitt aufgebracht. Nach 1 h wurden die Kristalle vorsichtig mit 0,9 % NaCl-Lösung vom Nerv abgespült und aus der Wunde entfernt. Diese wurde durch eine Muskel- und Hautnaht verschlossen. Nach der OP wurden die Tiere warm gehalten und Harn- und Kotabsatz postoperativ kontrolliert.

6.2.2 Gewebeaufarbeitung der DRGs und des Rückenmarks nach Fluoreszenzmarkierung

Zwei Wochen nach der Applikation des Fluoreszenzfarbstoffs wurden die Tiere durch Einleitung von CO₂ in den Käfig getötet. Im Anschluss wurde der linke Oberschenkel mit 70 % Alkohol desinfiziert und das implantierte Silikonröhrchen freigelegt. Das Implantat wurde von umgebendem Bindegewebe befreit, der N. ischiadicus distal und proximal des Röhrchens durchtrennt und das Röhrchen entnommen. Die Gewebeaufarbeitung der Implantate ist in Punkt 7. aufgeführt. Anschließend wurde der Brustkorb der Tiere mit einer chirurgischen Schere

geöffnet, das Herz freigelegt und das Perikard stumpf eröffnet. In die linke Herzkammer wurde eine Perfusionskanüle eingeführt, über die ca. 100 ml 0,9%ige NaCl-Lösung zum Spülen und anschließend ca. 150 ml 4%ige PFA-Lösung eingeleitet wurden, um den Körper durch Perfusion zu fixieren. Nach der Perfusion wurde das Rückenmark freipräpariert und der lumbale Bereich L4-L6 und die entsprechenden DRGs (L4-L6) der linken Seite entnommen.

Das Gewebe wurde über Nacht in 4%iger PFA-Lösung nachfixiert, in 30%ige Saccharose-Lösung für mindestens 24 h gelagert und anschließend in TissueTek aufgefroren. Am Cryostaten wurden von den DRGs 14 μ m und vom Rückenmark 25 μ m dicke Schnitte angefertigt und auf unbeschichtete Objektträger aufgezogen.

6.2.3 Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung

Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Dil markierten Zellen in den DRGs und des Rückenmarks wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Filter: U-MWB: BP 450-480, DM 500, BA 515, Olympus) quantifiziert. Die im Vorderhorn des Rückenmarks lokalisierten Motoneurone wurden bei 200facher Vergrößerung auf jedem 5. Schnitt ausgezählt, die Anzahl summiert, für die gesamte Schnittzahl interpoliert und anschließend der Mittelwert und Standardfehler (SEM) pro Tiergruppe berechnet.

Die Anzahl an sensorischen Neuronen in den DRGs wurde prozentual ausgewertet. Hierzu wurden die Gesamtzellzahl und die Zahl der markierten Neurone bei 400facher Vergrößerung ausgezählt. Es wurden pro DRG jeweils 5 Schnitte ausgewertet. Für jedes Tier wurden jeweils die Mittelwerte der 3 entnommenen DRGs (L4-L6) gebildet und daraus der Mittelwert und der SEM der jeweiligen Tiergruppe berechnet.

7. Explantation des regenerierten Gewebes und Gewebeaufarbeitung

Nach 3 bzw. 6 Monaten wurden die Silikonröhrchen explantiert. Dazu wurde, nachdem die Tiere durch Einleitung von CO₂ getötet wurden, die linke Hinterextremität mit 70%igem Alkohol desinfiziert und der N. ischiadicus mit dem Implantat freigelegt. Der Nerv wurde ober- und unterhalb des Röhrchens durchtrennt und das entnommene Implantat sofort in Karnovsky-Fixans (2 % PFA, 2,5 % Glutaraldehyd in 0,2 M Na-Caco-Dylat-Puffer, pH 7,3) überführt. Neben regenerierten Gewebekabeln wurden auch die proximalen und distalen Stümpfe aus leeren Silikonröhrchen mit aufgearbeitet. Nach 24 h wurde das im Röhrchen enthaltene Gewebe herauspräpariert und 3 mal für 10 min mit einem 0,1 M Na-CaCo-Puffer, der 7,5 % Saccharose enthielt, gespült. Das Gewebe wurde 1,5 h in 1 % OsO₄ nachfixiert und eine Markscheidenfärbung nach Schultze (SCHULTZE, 1910) in 1 % Kalium-Dichromat (24 h), gefolgt von einem Alkohol-Schritt (25 %, 24 h), einer Hämatoxylin-Färbung (0,5 % in 70 % Alkohol, 24 h) und mehrmaligem Auswaschen von Farbüberschüssen mit 25% Alkohol, durchgeführt. Darauf folgte eine Entwässerungsreihe in reinem Alkohol: 2 mal 5 min 50 % Alkohol, 2 mal 5 min 75 % Alkohol, 2 mal 5 min 90 % Alkohol und 6 mal 5 min 100 % Alkohol. Anschließend wurde das Gewebe in ein Epoxidharz (16,7 % DDSA, 34,9 % MNA, 47,9 % Glycidether, 1,5 % DMP30) eingebettet. Nachdem das Epoxidharz im Trockenschrank (20 h bei 40°C gefolgt von 40 h bei 60°C) ausgehärtet war, wurden an einem Ultramikrotom mit frisch gebrochenen Glasmessern 1 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt, die bei 60°C auf einer Heizplatte ohne Klebemittel auf unbeschichtete Objektträger aufgebrannt wurden. Um den Kontrast der Markscheidenfärbung weiter zu erhöhen, wurden die Schnitte mit einer 0,1%igen Toluidinblaulösung nachgefärbt und anschließend mit Corbitbalm eingedeckt. Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden mit einem Diamantmesser 50 nm dicke Ultradünnschnitte angefertigt. Diese wurden mit Formvar-beschichteten Kupfer-Netzen aufgefangen und mit Uranyl-Acetat (5 min) und Reynold-Lösung (3 min) kontrastiert.

Semi- und ultradünne Querschnitte wurden distal des proximalen Nervenstumpfes an definierten Punkten der regenerierten Gewebekabel angefertigt. Bei der 3-Monats-Gruppe wurden Semidünnschnitte bei +1,0 mm, bei +5,0 mm, bei +7,0 mm und am Endpunkt regenerierter, myelinisierter Axone (>7,0 mm) und Ultradünnschnitte bei +1,0 mm und >7,0 mm geschnitten und ausgewertet. In der 6-Monats-Gruppe wurden Semidünnschnitte an Punkt +7,0 mm und +15,0 mm und Ultradünnschnitte nur bei +15,0 mm untersucht.

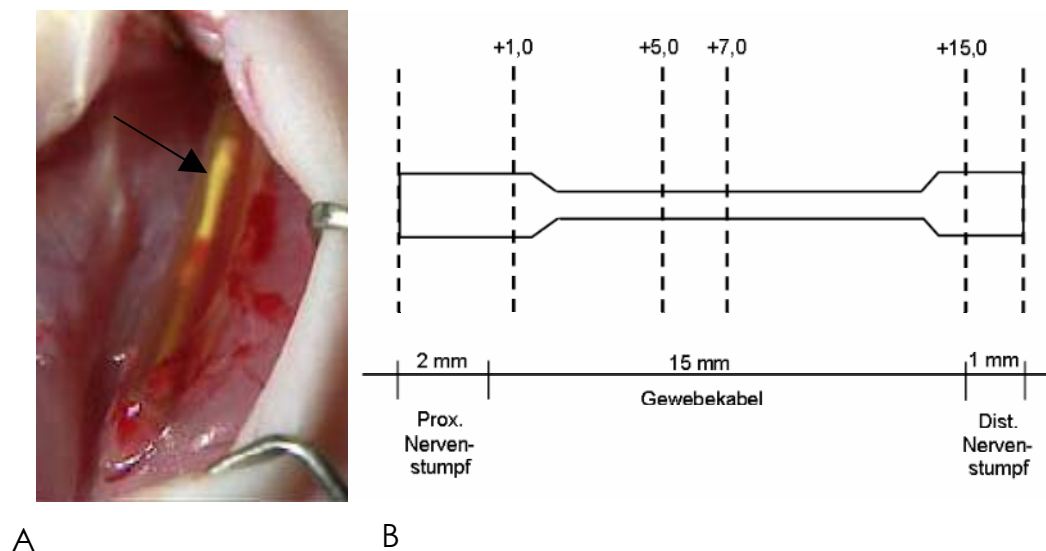


Abb. 6 Silikonröhrchen mit regeneriertem Gewebekabel (Pfeil) kurz vor der Explantation (A); Schema eines explantierten Gewebekabels (B). Das Silikonröhrchen hatte eine Gesamtlänge von 18 mm. Der proximale Nervenstumpf war 2 mm und der distale Nervenstumpf 1 mm in das Implantat eingebracht. Die daraus resultierende Lücke zwischen den Stümpfen betrug 15 mm. Des Weiteren sind im Schema (B) die verschiedenen Schnittpunkte durch die Gewebekabel eingezeichnet.

8. Quantitative Analyse des Regenerationserfolges

Zur quantitativen Auswertung des regenerierten Gewebes wurden die gewonnenen Semidünnschnitte mit einer Color View 12-Kamera an einem BX Olympus-Mikroskop bei 400facher Vergrößerung mit dem Computerprogramm AnalySIS-Pro® aufgenommen.

Da bei 400facher Vergrößerung nicht der gesamte Nervenquerschnitt auf ein Bild passte, wurden mittels der Programmfunktion „Multiple Image Alignment“ mehrere Einzelbilder zu einem Gesamtbild zusammengesetzt und dieses im tif-Format gespeichert. Die morphometrische Auswertung der Nervenquerschnitte erfolgte halbautomatisch mit einem speziellen in der Abteilung Neuroanatomie entwickelten Computermakro auf der Basis von AnalySIS-Pro® (TIMMER *et al.*, 2003).

Bei der 3-Monats-Gruppe wurde der prozentuale Anteil von Gewebekabeln, die regenerierte myelinisierte Axone aufwiesen und in denen diese über die Mitte des Silikonröhrchens hinaus gewachsen waren, berechnet. Weiterhin wurde an den definierten Schnittpunkten die absolute Anzahl, der Durchmesser und der g-ratio der regenerierten myelinisierten Axone bestimmt.

Aufgrund einer sehr hohen Axonanzahl bei +1,0 mm wurde hier nicht der Gesamtquerschnitt, sondern nur eine Fläche von 10.000 μm^2 ausgezählt und die Axonanzahl für den gesamten Querschnitt interpoliert. Die Anzahl der Axone wurde bei +5,0 mm, bei +7,0 mm und >7,0 mm für den gesamten Querschnitt ausgezählt. Des Weiteren wurde an den definierten Schnittpunkten die Querschnittsfläche der Semidünnschnitte vermessen und die Axonanzahl pro mm^2 (Nervendichte) berechnet.

Beim g-ratio handelt es sich um einen Index, der den Grad der Myelinisierung eines Axons angibt. Er errechnet sich aus dem Verhältnis von Axondurchmesser und dem gesamten Faserdurchmesser. Je kleiner der g-ratio ist, umso besser ist das Axon myelinisiert. Der g-ratio wurde für jeweils 100 beliebige Axone pro Querschnitt berechnet. Axondurchmesser und der gesamte Faserdurchmesser wurden mit AnalySIS-Pro® vermessen.

Des Weiteren wurde nach 3 Monaten der prozentuale Anteil an Gefäßen mit einer Mindestfläche von 10 μm^2 berechnet.

Bei der 6-Monats-Gruppe wurden der prozentuale Anteil an Gewebekabeln, die regenerierte myelinisierte Fasern bei +15 mm enthielten, sowie die Axonanzahl, der Durchmesser und der g-ratio bei Schnittpunkt +7,0 mm bestimmt. Eine Übersicht zu den ausgewerteten Parametern ist in Abb. 24 und Tab. 1 gegeben.

9. Ultrastrukturelle Auswertung des Regenerationserfolges anhand elektronenmikroskopischer Bilder

Die Beurteilung der Qualität des regenerierten Gewebes auf ultrastruktureller Ebene erfolgte anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die an definierten Schnittstellen der Regenerate angefertigt wurden (Tab. 1). Die Ultradünnschnitte wurden bzgl. morphologischer Unterschiede ausgewertet. Es wurden die Beschaffenheit von Epi-, Peri- und Endoneurium, die Struktur des Bindegewebes, die Anzahl, Größe und Anordnung von Blutgefäßen, das Vorkommen markloser Fasern sowie der Aufbau, die Lage und die Anzahl der Myelinringe markhaltiger Axone bewertet.

10. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurden die Daten zuerst auf eine Normalverteilung hin untersucht. Lag eine Normalverteilung vor, wurden alle Tiergruppen mittels einer ANOVA-Varianzanalyse und dem Fisher-PLSD-posthoc-Test auf signifikante Unterschiede getestet. Anschließend wurden die einzelnen Tiergruppen mit dem Students-t-Test gegeneinander verglichen. Wurden normalverteilte Merkmale innerhalb einer Tiergruppe untersucht, wurde mit dem t-Test gearbeitet. Lag keine Normalverteilung vor oder war der Stichprobenumfang zu gering, wurden erst alle Tiergruppen mittels des Kruskal-Wallis-Test auf signifikante Unterschiede getestet und anschließend jeweils zwei Tiergruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

Lagen kategoriale Daten vor, die nicht miteinander verbunden waren, wurden sie mit dem Chi-Quadrat-Test auf Signifikanzen getestet.

III. Ergebnisse

1. 3 Monats-Studie

1.1 Analyse der funktionellen Regeneration

Um nach der Läsion des N. ischiadicus und anschließender Implantation des Silikonröhrchens die funktionelle motorische Regeneration zu bestimmen, wurden von den Tieren vor der OP, 6 Wochen und 3 Monate nach der OP die Laufmuster genommen und jeweils der SFI berechnet. Nach Läsion des N. ischiadicus und Einsetzen des Implantates veränderte sich die Fußhaltung der betroffenen Seite und das Laufmuster (Abb. 7B, D, F) gegenüber der physiologischen Fußhaltung und dem normalen Laufmuster (Abb. 7A, C, E).

Der anhand der Laufmuster bestimmte, mittlere SFI lag vor der OP in allen Tiergruppen annähernd bei 0 (Matrigel $-12,47 \pm 7,49$; SZneo $-0,66 \pm 5,15$; 18-kDa $4,34 \pm 2,37$; KV $-7,79 \pm 5,14$; HMW $-4,92 \pm 4,57$). Als Ausdruck einer starken Beeinträchtigung des N. ischiadicus der linken Seite wiesen alle Tiergruppen 6 Wochen nach der Implantation einen signifikant schlechteren mittleren SFI von ca. -100 auf (Matrigel $-87,47 \pm 9,26$; SZneo $-101,91 \pm 3,48$; 18-kDa $-90,05 \pm 4,34$; KV $-96,65 \pm 4,15$; HMW $-92,94 \pm 4,39$). 3 Monate nach der Operation war anhand der Laufmuster noch keine Verbesserung der funktionellen Regeneration zu sehen (Matrigel $-80,45 \pm 7,04$; SZneo $-86,21 \pm 6,52$; 18-kDa $-84,79 \pm 3,49$; KV $-96,54 \pm 2,52$; HMW $-95,71 \pm 2,36$; Abb. 8). Signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen sind auf interindividuelle Unterschiede zurückzuführen, da nicht alle Tiere aus der gleichen Zucht bezogen werden konnten.

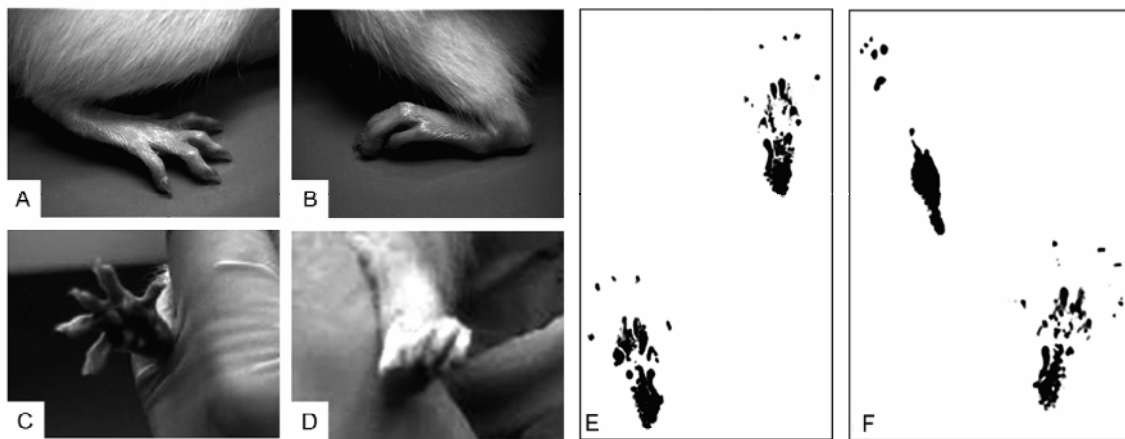


Abb. 7 Physiologischer Zustand einer intakten (A, C) und einer läsierten (B, D) Hinterpfote mit den dazugehörigen Laufmustern (E, F). Nach der Läsion des N. ischiadicus und der Implantation der Silikonröhrchen liefen die Tiere nicht mehr auf dem Fußballen, sondern setzten die gesamte Pfote auf (B). Daraus resultierte ein erhöhter Print-length-Wert. Auf Bild D ist deutlich das verminderte Zehenspreizen nach der N. ischiadicus-Läsion auf der linken Seite zu sehen. Der erhöhte PL-Wert und der verringerte TS- und ITS-Wert führten zu einem negativen SFI.

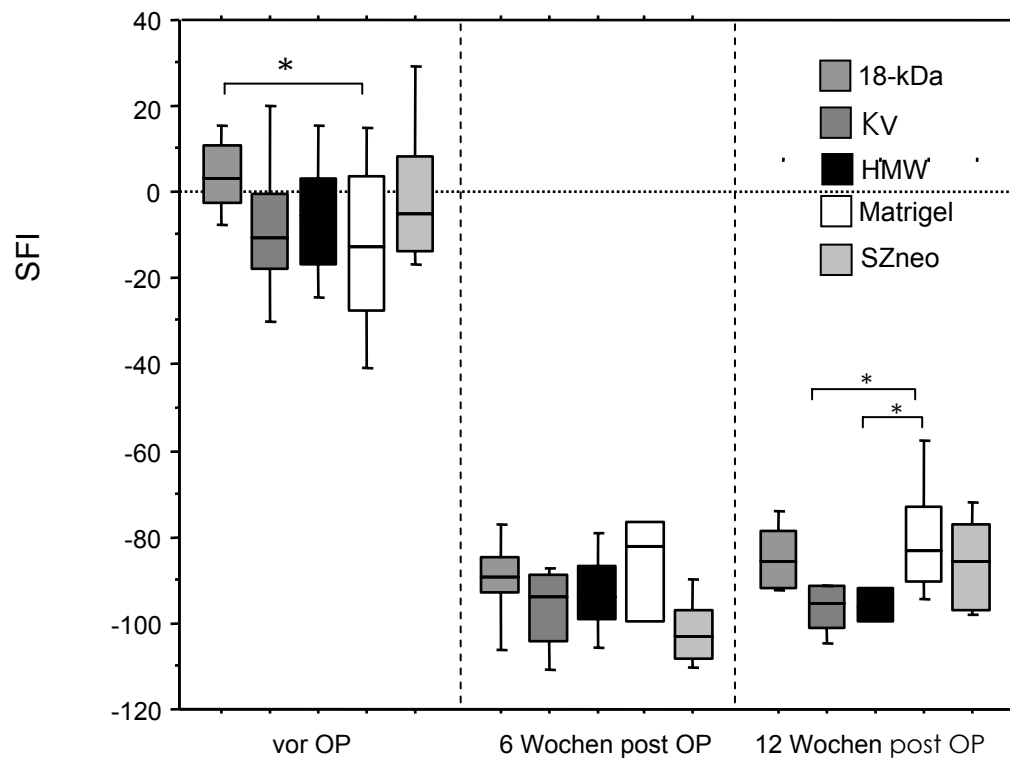


Abb. 8 Sciatic Function Index (SFI) der verschiedenen Tiergruppen vor, 6 Wochen und 12 Wochen nach Läsion des linken N. ischiadicus. Dargestellt sind der Median, das 10., 25., 75. und 90. Quantil. Die Daten wurden mit einer ANOVA-Varianzanalyse und dem Fisher-PLSD-Test auf Signifikanzen überprüft (* = $p < 0,05$), (**Vor OP**: Matrigel $n = 10$, SZneo $n = 13$, 18-kDa $n = 13$, KV $n = 11$, HMW $n = 11$; **6 Wochen post OP**: Matrigel $n = 3$, SZneo $n = 6$, 18-kDa $n = 7$, KV $n = 5$, HMW $n = 5$; **12 Wochen post OP**: Matrigel $n = 5$, SZneo $n = 5$, 18-kDa $n = 5$, KV $n = 5$, HMW $n = 4$)

1.2 Quantitative Analyse des Regenerationserfolges

Drei Monate nach Implantation der unterschiedlich befüllten Silikonröhrchen wurden die Tiere getötet, die Röhrchen explantiert, und das regenerierte Gewebe eingebettet, geschnitten und morphometrisch ausgewertet. Es wurde die Distanz, über die regenerierte myelinisierte Fasern ausgewachsen waren, sowie ihre absolute Anzahl, ihr Durchmesser und ihr g-ratio an definierten Querschnittspunkten durch das regenerierte Gewebe bestimmt. Zusätzlich wurde an diesen Schnittpunkten die Querschnittsfläche des regenerierten Gewebes vermessen und die jeweilige Nervendichte (myelinisierte Axone / mm²) berechnet. Weiterhin wurde der prozentuale Anteil von Gefäßen mit einer Mindestfläche von 10 µm² am Schnittpunkt +5,0 mm bestimmt. Die Daten wurden auf signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen und auf signifikante Unterschiede innerhalb der Tiergruppen untersucht.

1.2.1 Distanz regenerierter myelinisierter Fasern

Es wurde pro Tiergruppe der prozentuale Anteil an Gewebekabeln bestimmt, die über die Mitte (+7,5 mm) des Implantates hinaus gewachsen waren und regenerierte myelinisierte Fasern aufwiesen (Abb. 9). Nach Implantation von Silikonröhrchen, die nur Matrigel enthielten, waren bei 4 von 10 Tieren regenerierte Gewebekabel vorhanden. Zwei dieser Kabel wiesen myelinisierte Axone auf, die jedoch nicht über die Mitte des Kabels hinaus gewachsen waren (0 %). In der SZneo-Gruppe befanden sich in 7 von 8 regenerierten Gewebekabeln myelinisierte Axone, die in 4 Fällen (57 %) über die Mitte und in einem Fall bis zum distalen Stumpf (+15,0 mm) gewachsen waren. Die KV-Gruppe besaß in 6 von 6 Gewebekabeln myelinisierte Axone, die bei 5 Tieren (83 %) über die Mitte bis zum distalen Stumpf (+15,0 mm) regeneriert waren. In der 18-kDa-Gruppe wiesen 3 von 5 (60 %) Gewebekabeln regenerierte Axone distal der Mitte des Implantates auf. Signifikant mehr Gewebekabel, die über die Mitte hinaus myelinisiert waren, als in allen anderen Tiergruppen fanden sich in der HMW-

Gruppe. In 7 von 7 Gewebekabeln (100 %) waren die Axone über die Mitte und davon in 4 Kabeln bis zum distalen Stumpf regeneriert.

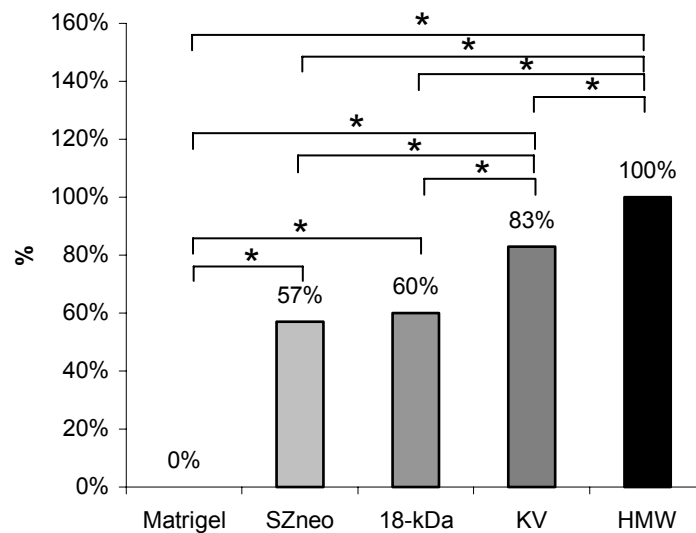


Abb. 9 Prozentualer Anteil an Gewebekabeln, die regenerierte myelinisierte Fasern enthielten, die über die Mitte des Implantates hinaus gewachsen waren. Die Daten wurden mit dem Chi-Quadrat-Test auf Signifikanzen geprüft (* = $p < 0,05$). (Matrigel $n = 10$, SZneo $n = 13$, 18-kDa $n = 13$, KV $n = 11$, HMW $n = 11$)

1.2.2 Anzahl regenerierter myelinisierter Axone

Die quantitative Auswertung der Anzahl, des Durchmessers und des g-ratios myelinisierter Axone wurde halbautomatisch mit einem speziellen Computermakro auf der Basis von AnalySISPro® durchgeführt (TIMMER *et al.*, 2003). Die morphometrische Auswertung regenerierter myelinisierter Axone wurde an den verschiedenen Schnittpunkten +1,0 mm, +5,0 mm, +7,0 mm und an dem am weitesten distal im Regenerat gelegenen Punkt (>7,0 mm) bestimmt. Exemplarische Aufnahmen von Semidünnschnitten aus den einzelnen Tiergruppen bei Schnittpunkt +5,0 mm sind in Abb. 10 dargestellt.

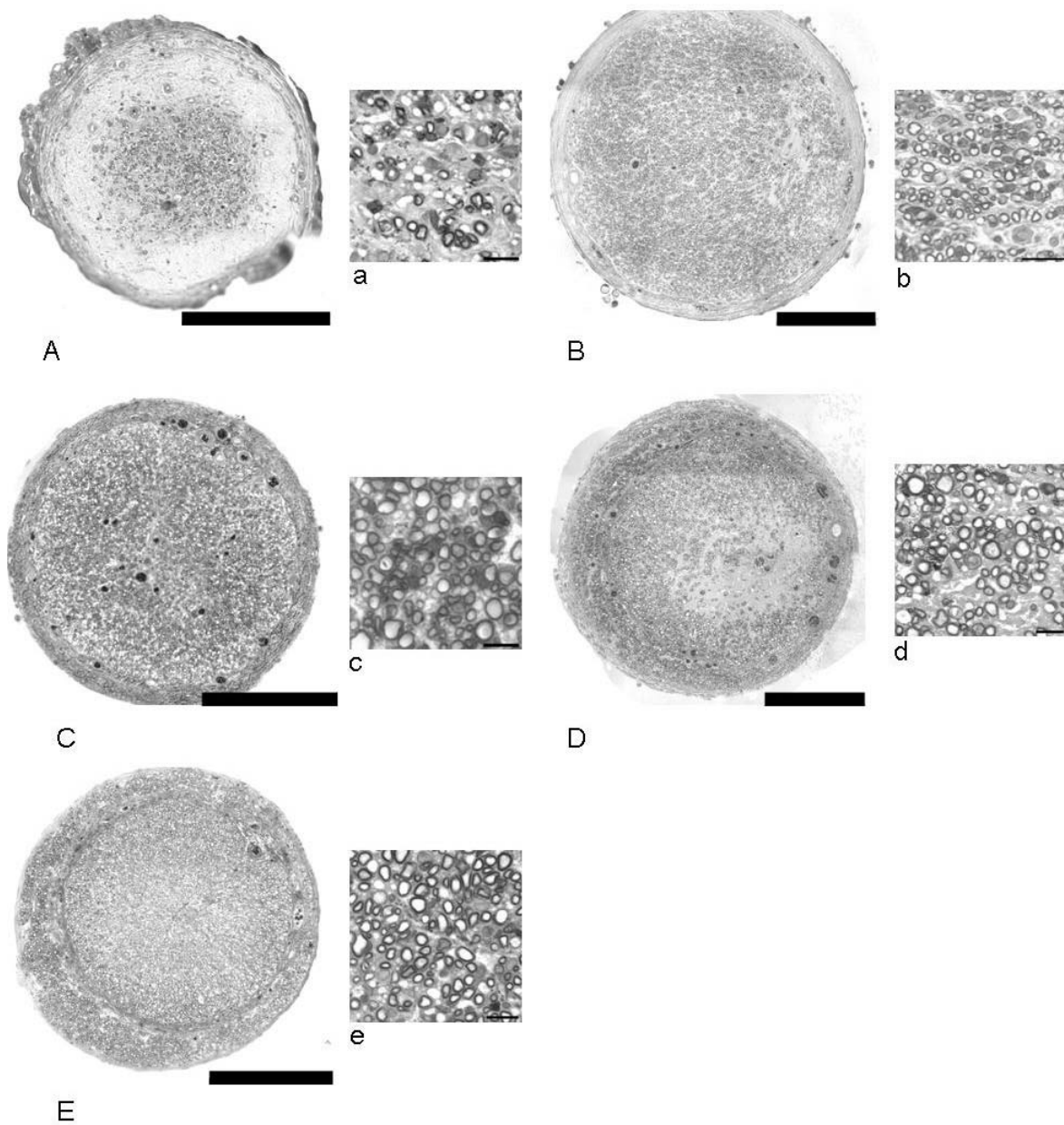


Abb. 10 Exemplarische Semidünnschnitte (A-E) mit Ausschnittsvergrößerungen (a-e) der jeweiligen Querschnitte am Schnittpunkt +5,0 mm der einzelnen Tiergruppen (A, a) Matrigel, (B, b) SZneo, (C, c) 18-kDa, (D, d) KV und (E, e) HMW. In den Ausschnittsvergrößerungen sind deutlich myelinisierte Axone mit umgebendem Bindegewebe zu erkennen. (A-E Balken 200 μ m, a-e Balken 10 μ m)

Die morphometrischen Daten wie die absolute Axonanzahl, der Durchmesser und der g-ratio der regenerierten myelinisierten Axone der verschiedenen experimentellen Gruppen wurden zum einen pro Schnittpunkt (Abb. 12) und zum anderen innerhalb der Tiergruppen (Abb. 13) grafisch aufgetragen. In Tab. 2 im Anhang sind die Ergebnisdaten der absoluten Axonanzahl, des g-ratios, der Querschnittsfläche und der Nervendichte aufgeführt.

An Schnittpunkt +1,0 mm konnten die meisten myelinisierten Axone in der Matrigel-Gruppe (31.002 & 20.890) gezählt werden. Die anderen Tiergruppen wiesen Axonzahlen von 16.641 ± 2.618 in der SZneo-Gruppe, 10.076 ± 6.495 in der 18-kDa-Gruppe, 9.116 ± 4.594 in der KV-Gruppe und bis zu 6.689 ± 1.623 in der HMW-Gruppe auf. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren aufgrund des hohen Standardfehlers nicht signifikant (Abb. 12A).

Vergleich man die Axonanzahl zwischen +1,0 mm und +5,0 mm, war deutlich zu erkennen, dass der Grossteil der regenerierten Axone nicht bis +5,0 mm weiter gewachsen war (Abb. 12A, Abb. 13A). Die Anzahl der myelinisierten Axone war bei +5,0 mm deutlich geringer als noch bei +1,0 mm. Überraschenderweise war zu sehen, dass in der HMW-Gruppe, die bei +1,0 mm die geringste Axonanzahl aufwies, prozentual die meisten Axone nach distal weiter regenerierten (Matrigel 1 %, SZneo 6 %, 18-kDa 9 %, KV 15 %, HMW 29 %) (Abb. 11).

Die Anzahl der auswachsenden Axone nahm mit Ausnahme der KV-Gruppe in allen Tiergruppen mit zunehmender Distanz zum proximalen Stumpf immer weiter ab. In der KV-Gruppe konnte von +7,0 mm zu >7,0 mm eine Zunahme der myelinisierten Fasern beobachtet werden (Abb. 12A, 13A), was auf eine Aufzweigung der Axone (Sprouting-Effekt) hindeutet.

Da in der HMW-Gruppe ausgehend von +1,0 mm prozentual die meisten Axone weiter nach distal ausgewachsen sind, waren bei den Schnittpunkten +5,0 mm, +7,0 mm und >7,0 mm dieser Gruppe tendenziell die meisten myelinisierten Axone zu finden (Abb. 12A).

Um die Nervendichte (Axonanzahl / mm^2) zu berechnen, wurden die Querschnittsflächen der regenerierten Gewebekabel in mm^2 an den definierten Schnittstellen bestimmt (Abb. 14C,D).

Die Querschnittsfläche nahm in der Matrigel-, SZneo-, 18-kDa- und KV-Gruppe von proximal zur Mitte und zum Ende der Regenerate (+5,0 mm, +7,0 mm und

>7,0 mm) signifikant ab. Weiter distal (>7,0 mm) stieg die Fläche der Querschnitte in allen Gruppen, außer der SZneo-Gruppe, wieder leicht an. In der HMW-Gruppe zeigte eine vergleichbare Entwicklung der Querschnittsflächenab- und zunahme weniger deutliche Unterschiede (Abb. 14D).

Der Vergleich der Querschnittsflächen der einzelnen Gruppen miteinander, zeigte bei +1,0 mm im Mittel eine deutlich größere Querschnittsfläche in der SZneo-Gruppe im Vergleich zu der 18-kDa-, KV- und HMW-Gruppe. Am Endpunkt der regenerierten Axone (>7,0 mm) wiesen die 18-kDa- und HMW-Gruppe die größten Querschnittsflächen auf (Abb. 14C).

Die errechnete Nervendichte der einzelnen Tiergruppen unterschied sich bei +1,0 mm, +5,0 mm und +7,0 mm nicht. Am Endpunkt (>7,0 mm) der regenerierten Axone zeigten sich im Vergleich zu den anderen Tiergruppen deutlich mehr Axone in der KV-Gruppe (Abb. 14A).

Verglich man die Nervendichten der unterschiedlichen Schnittpunkte innerhalb der Tiergruppen, fiel auf, dass die Nervendichte in der SZneo-, 18-kDa-, KV- und HMW-Gruppe bei +1,0 mm, +5,0 mm und +7,0 mm relativ konstant ist (Abb. 14B). Erst bei >7,0 mm war in diesen Gruppen mit Ausnahme der KV-Gruppe eine geringere Nervendichte zu sehen. Ursache hierfür ist das gleich bleibende Verhältnis von der Axonanzahl zur Querschnittsfläche aufgrund der starken Verringerung der Querschnittsfläche von +1,0 mm nach +5,0 mm (Abb. 14C,D) und die geringeren absoluten Axonanzahlen bei +5,0 mm und +7,0 mm (Abb. 12A & Abb. 13A).

Bei >7,0 mm kam es bei sinkender absoluter Axonanzahl zu einem leichten Anstieg der Querschnittsfläche, wodurch sich das Verhältnis von Axonanzahl und Querschnittsfläche veränderte, was zu einer geringeren Nervendichte an diesem Schnittpunkt führte.

Nur die KV-Gruppe zeigte bei >7,0 mm keine geringere Nervendichte (Abb. 14B). Selbst bei >7,0 mm war bei dieser Tiergruppe die Axonanzahl bei einer relativ kleinen Querschnittsfläche sehr hoch (Abb. 14A,B), was, wie auch schon bei der absoluten Anzahl erwähnt, auf einen Sprouting-Effekt der Axone hinweist.

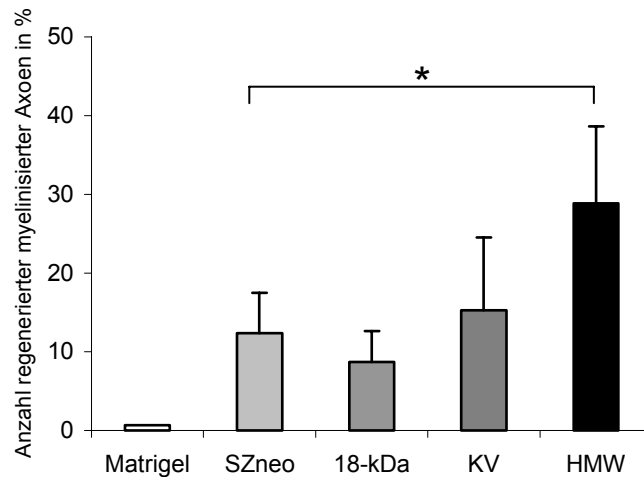


Abb. 11 Prozentualer Anteil der Anzahl regenerierter myelinisierter Axone, die von Schnittpunkt +1,0 mm bis zu +5,0 mm regeneriert sind. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die Daten wurden mit einer ANOVA-Varianzanalyse und dem Fisher-PLSD post hoc Test auf Signifikanzen geprüft (*= $p < 0,05$). (Matrigel $n = 2$, SZneo $n = 7$, 18-kDa $n = 5$, KV $n = 6$, HMW $n = 7$)

1.2.3 Durchmesser regenerierter myelinisierter Axone

Der Durchmesser der regenerierten myelinisierten Axone wurde mittels des Computermakros automatisch für alle gezählten Axone bestimmt.

Bei +5,0 mm war der Durchmesser der myelinisierten Axone in der HMW-Gruppe ($2,50 \mu\text{m} \pm 0,07 \mu\text{m}$) signifikant kleiner im Vergleich zur KV-Gruppe ($2,95 \mu\text{m} \pm 0,21 \mu\text{m}$) (Abb. 12B). An den anderen Schnittpunkten wiesen die Durchmesser der verschiedenen Tiergruppen keine Unterschiede auf.

Ein Vergleich der Axondurchmesser innerhalb der Tiergruppen zeigte in allen Tiergruppen einen geringeren Durchmesser der Axone in der Mitte der Regenerate (+5,0 mm und +7,0 mm) im Vergleich zum Beginn (+1,0 mm) und Endpunkt (>7,0 mm) (Abb. 13B).

In der SZneo-Gruppe waren die Unterschiede des Axondurchmessers von +1,0 mm zu +5,0 mm und +7,0 mm signifikant; die Zunahme des Durchmessers von +7,0 mm zu >7,0 mm allerdings nicht. In der 18-kDa-Gruppe konnte von

+1,0 mm zu +7,0 mm ein signifikanter Abfall und von +7,0 mm zu >7,0 mm eine signifikante Zunahme des Axondurchmessers verzeichnet werden. Der Durchmesser der regenerierten Axone in der HMW-Gruppe verringerte sich von +1,0 mm nach +5,0 mm signifikant und stieg dann von +5,0 mm nach >7,0 mm wieder stetig an.

1.2.4 G-ratio regenerierter myelinisierter Axone

Der g-ratio, ein Index für den Grad der Myelinisierung eines Axons, wurde pro Schnittpunkt für 100 Axone bestimmt. Je kleiner der g-ratio ist, umso besser ist die Myelinisierung der Axone. Vergleich man die g-ratios der verschiedenen experimentellen Gruppen an den unterschiedlichen Schnittpunkten, war eine tendenziell schlechtere Myelinisierung der Axone in der HMW-Gruppe bei +1,0 mm, +5,0 mm und +7,0 mm zu sehen (Abb. 12C). Am Endpunkt der regenerierten myelinisierten Axone ist jedoch der g-ratio, und somit die Myelinisierung, in der HMW-Gruppe besser als in den anderen Tiergruppen. Die schlechteste Myelinisierung wiesen an diesem Punkt die Axone in der KV-Gruppe auf.

In der HMW-Gruppe zeigte sich mit zunehmender Distanz vom proximalen Stumpf ein Abfall des g-ratio und damit eine bessere Myelinisierung regenerierter Axone, während der g-ratio in den anderen Tiergruppen von +1,0 mm nach +5,0 mm abfiel und dann wieder anstieg (Abb. 13C).

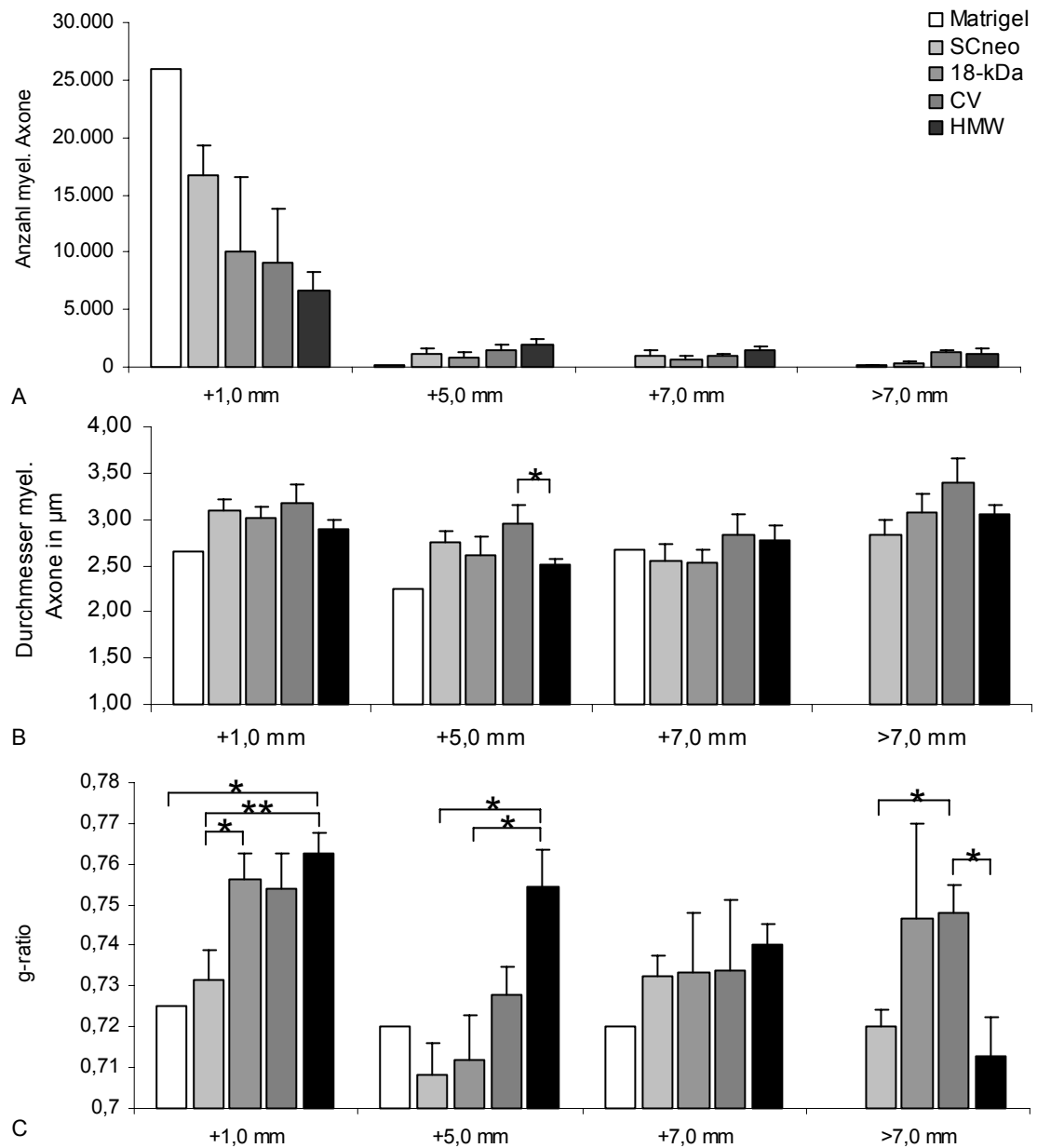


Abb. 12 Darstellung der morphometrischen Daten an den jeweiligen Schnittpunkten: Anzahl (A), Durchmesser (B) und g-ratio (C) regenerierter myelinisierter Axone. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die Daten wurden mit dem Students-t-Test auf Signifikanzen geprüft, es sind signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Tiergruppen gekennzeichnet, Unterschiede innerhalb der Gruppen sind Abb. 13 zu entnehmen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). (+1,0 mm: Matrigel n = 2, SZneo n = 7, 18-kDa n = 5, KV n = 6, HMW n = 7; +5,0 mm: Matrigel n = 1, SZneo n = 6, 18-kDa n = 5, KV n = 5, HMW n = 7; +7,0 mm: Matrigel n = 1, SZneo n = 4, 18-kDa n = 4, KV n = 5, HMW n = 7; >7,0 mm: Matrigel n = 0, SZneo n = 4, 18-kDa n = 3, KV n = 5, HMW n = 7)

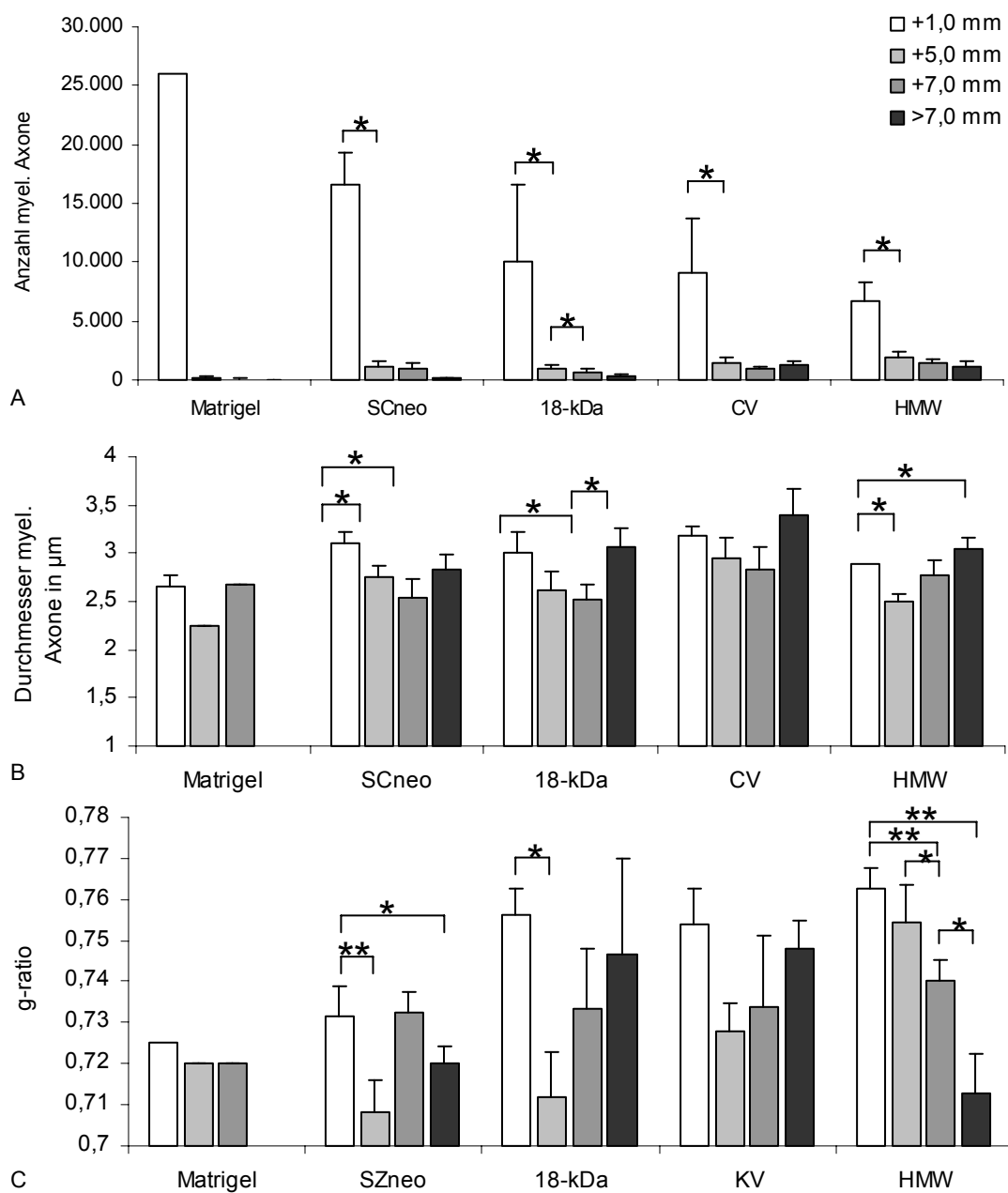


Abb. 13 Darstellung der morphometrischen Daten innerhalb der Tiergruppen: Anzahl (A), Durchmesser (B) und g-ratio (C) regenerierter myelinisierter Axone. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die Daten wurden mit dem t-Test auf Signifikanzen geprüft, es sind signifikante Unterschiede innerhalb der jeweiligen Tiergruppen gekennzeichnet, Unterschiede zwischen den Gruppen sind Abb. 12 zu entnehmen (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). (**+1,0 mm**: Matrigel $n = 2$, SZneo $n = 7$, 18-kDa $n = 5$, KV $n = 6$, HMW $n = 7$; **+5,0 mm**: Matrigel $n = 1$, SZneo $n = 6$, 18-kDa $n = 5$, KV $n = 5$, HMW $n = 7$; **+7,0 mm**: Matrigel $n = 1$, SZneo $n = 4$, 18-kDa $n = 4$, KV $n = 5$, HMW $n = 7$; **>7,0 mm**: Matrigel $n = 0$, SZneo $n = 4$, 18-kDa $n = 3$, KV $n = 5$, HMW $n = 7$)

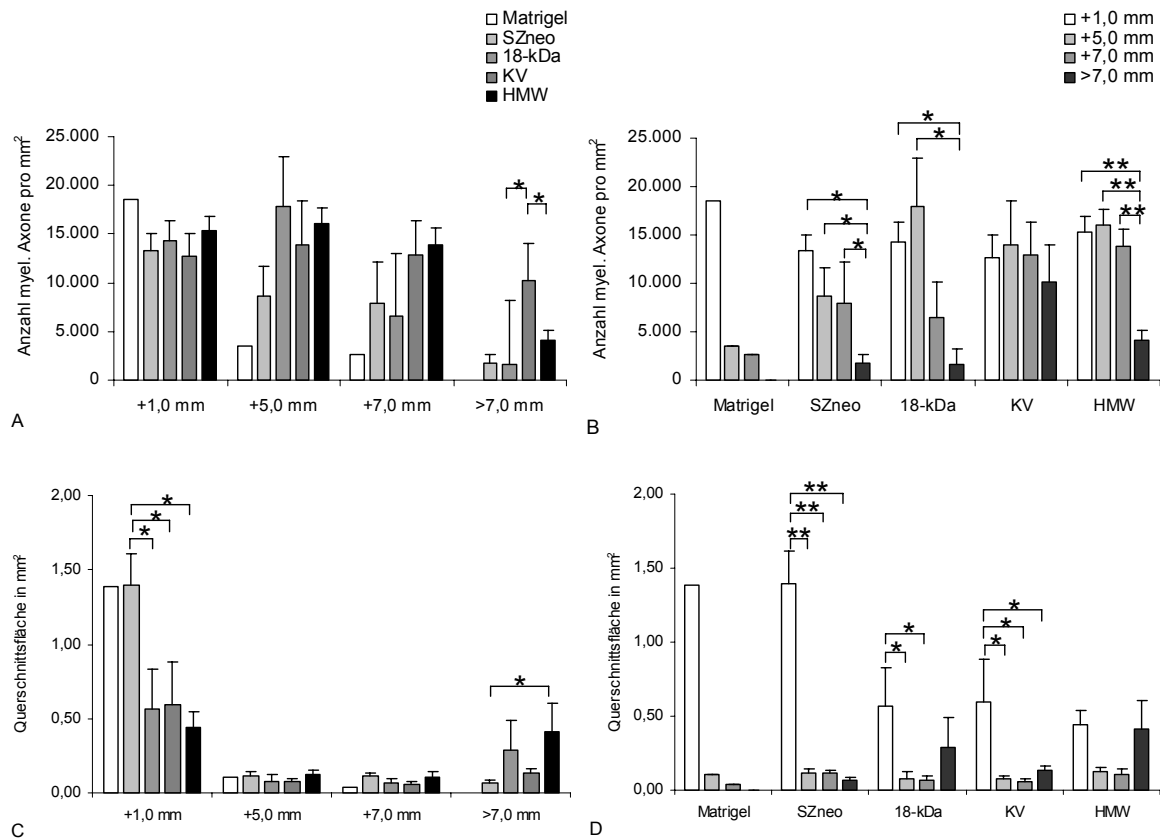


Abb. 14 Querschnittsfläche der regenerierten Gewebekabel und Anzahl regenerierter myelinisierter Axone/mm² an den verschiedenen Schnittpunkten (A,C) und innerhalb der Tiergruppen (B,D). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die Daten wurden mit dem t-Test (B,D) und einer ANOVA-Varianzanalyse und dem Fisher-PLSD post hoc Test (A,C) auf Signifikanzen geprüft (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$). (**+1,0 mm**: Matrigel $n = 2$, SZneo $n = 7$, 18-kDa $n = 5$, KV $n = 6$, HMW $n = 7$; **+5,0 mm**: Matrigel $n = 1$, SZneo $n = 6$, 18-kDa $n = 5$, KV $n = 5$, HMW $n = 7$; **+7,0 mm**: Matrigel $n = 1$, SZneo $n = 4$, 18-kDa $n = 4$, KV $n = 5$, HMW $n = 7$; **>7,0 mm**: Matrigel $n = 0$, SZneo $n = 4$, 18-kDa $n = 3$, KV $n = 5$, HMW $n = 7$)

1.2.5 Anteil an vaskularisierter Fläche am Gesamtquerschnitt

Da in der Literatur ein vaskularisierender Einfluss von FGF-2 beschrieben ist (ALOISI, 2003), sollte untersucht werden, ob die Isoformen den Grad der Vaskularisierung der Regenerate unterschiedlich beeinflussen. Es wurde bei +5,0 mm der prozentuale Anteil der Blutgefäße, die eine Mindestfläche von $10 \mu\text{m}^2$ hatten, berechnet.

In der HMW-Gruppe wurde ein signifikant kleinerer Anteil des Gesamtquerschnitts von Blutgefäßen mit einer Mindestfläche von $10 \mu\text{m}^2$ eingenommen ($1,23 \% \pm 0,18 \%$) als in den anderen Gruppen (Matrigel $2,11 \%$, SZneo $2,39 \% \pm 0,16 \%$, KV $2,26 \% \pm 0,40 \%$). Der durchschnittlich größte Anteil an Gefäßen fand sich in der 18-kDa-Gruppe ($2,62 \% \pm 0,23$) (Abb. 15).

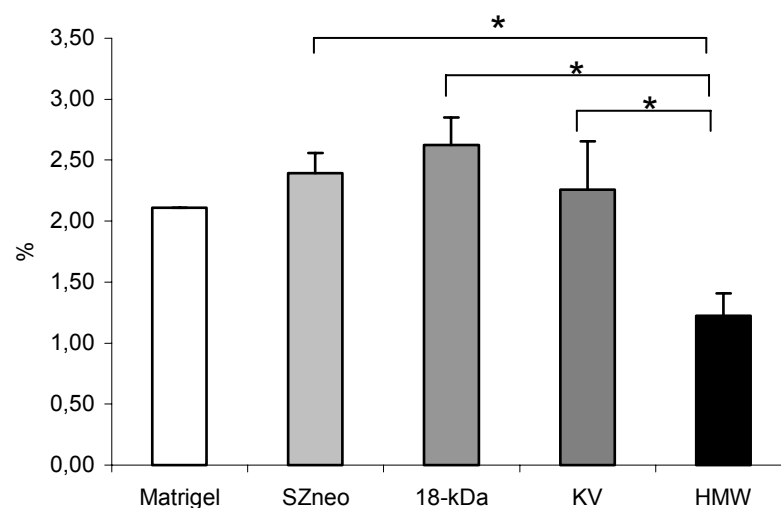


Abb. 15 Prozentualer Anteil an Blutgefäßen mit einer Mindestfläche von $10 \mu\text{m}^2$ an Schnittpunkt +5,0 mm. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die Daten wurden mit einer ANOVA-Varianzanalyse und dem Fisher-PLSD post hoc Test auf Signifikanzen geprüft (*= $p < 0,05$). (Matrigel $n = 2$, SZneo $n = 6$, 18-kDa $n = 5$, KV $n = 5$, HMW $n = 7$)

1.3 Ultrastrukturelle Analyse der Regenerate

Zur Untersuchung der Regenerate der einzelnen Tiergruppen auf ultrastruktureller Ebene wurden elektronenmikroskopische Bilder im proximalen (+1,0 mm) und im distalen (>7,0 mm) Bereich der Gewebekabel angefertigt. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen gaben detaillierten Aufschluss über die Struktur und Menge von Bindegewebe und Gefäßen in den Regeneraten. Auch die Verteilung sowohl myelinisierter als auch nicht-myelinisierter Fasern wurde ersichtlich. Nicht zuletzt konnte die Schichtung des Myelins, Kompaktheit und Anzahl der Myelinwicklungen genau untersucht werden.

In der SZneo-, 18-kDa-, KV- und HMW-Gruppe waren im distalen Bereich der regenerierten Gewebekabel myelinisierte und nicht-myelinisierte Axone deutlich zu erkennen (Abb. 16A-D). Weiterhin waren das Endoneurium und kollagene Fasern (Abb. 16A-C), sowie die Axone umhüllenden Schwann-Zellen und deren Zellkerne (Abb. 16A,B,D) zu sehen. Es gab bezüglich des ultrastrukturellen Aufbaus des regenerierten Gewebes keine Unterschiede zwischen den einzelnen Tiergruppen. Auch waren bei der Anzahl der Myelinwicklungen (SZneo 23, 18-kDa 24 ± 1 , KV 27 ± 2 , HMW 26 ± 2), die unter 16.000facher Vergrößerung gut sichtbar waren, keine Besonderheiten zu erkennen (Abb. 16a-d).

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen aus dem proximalen Bereich der Regenerate zeigten ebenfalls keine Unterschiede bzgl. ihrer Morphologie zwischen den Tiergruppen. Auch hier waren in allen Gruppen deutlich myelinisierte und nicht-myelinisierte Axone, sowie Schwann-Zellen und deren Zellkerne und Endo- und Perineurium zu erkennen.

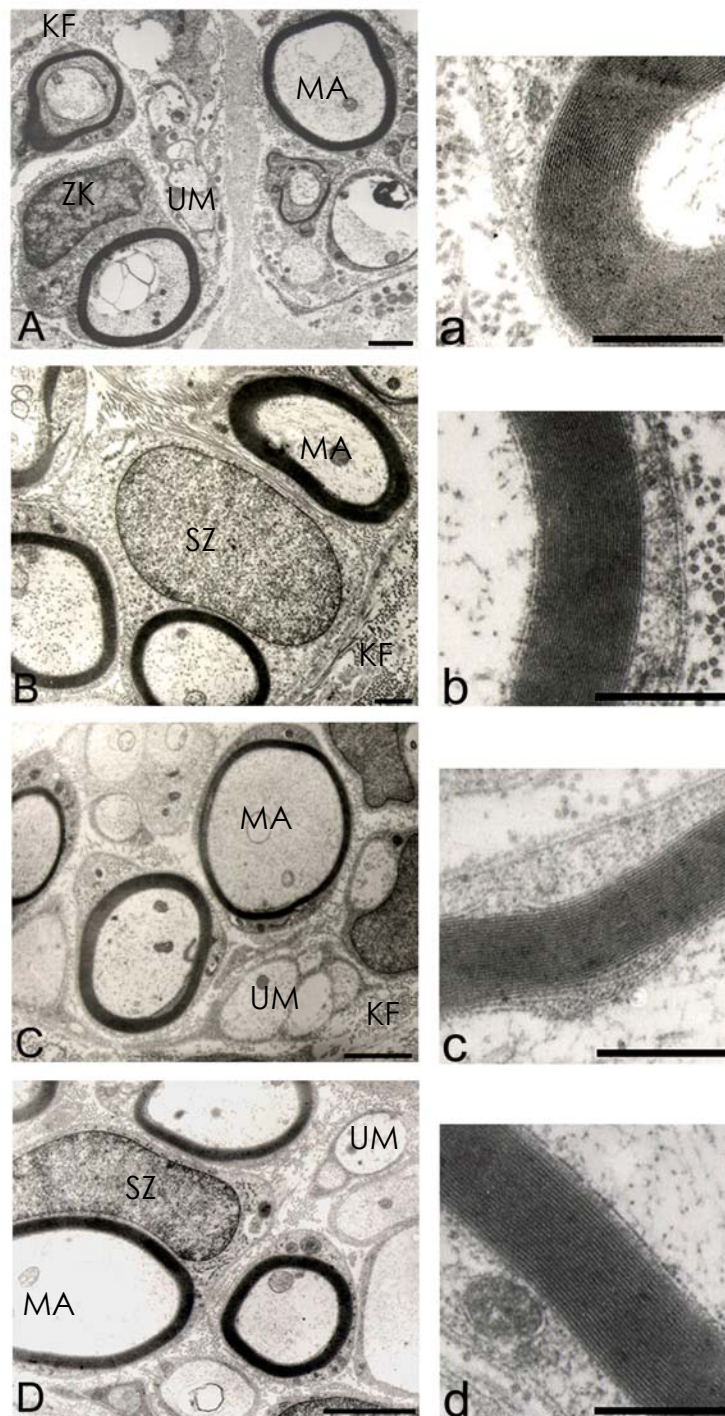


Abb. 16 Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus dem distalen Bereich der Regenerate aus den verschiedenen Tiergruppen (A-D) und Vergrößerung der Myelinwicklung (a-d). (A, a) SZneo, (B, b) 18-kDa, (C, c) KV und (D, d) HMW aus dem Bereich >7,0 mm mit Darstellung der myelinisierten Axone (MA), sowie nicht-myelinisierter Axone (UM), der Schwann-Zellen (SZ) und deren Zellkern (ZK), dem Endoneurium (Endo) und kollagenen Fasern (KF). (A-D: Balken 2 μ m; a-d Balken 1 μ m)

2. 6 Monats-Studie

2.1 Analyse der motorischen Regeneration

Aufgrund der nicht feststellbaren motorischen Regeneration 3 Monate nach Implantation in der 3-Monats-Gruppe wurde der SFI in der 6-Monats-Gruppe erst ab der 12. Woche bestimmt. Vor der Durchtrennung des N. ischiadicus und der Implantation der Silikonröhrchen betrug der SFI aller Tiergruppen annähernd 0 (SZneo $0,08 \pm 5,19$; 18-kDa $-8,29 \pm 3,50$; KV $-10,75 \pm 4,02$; HMW $-7,22 \pm 2,68$; Abb. 17). Nach 3 Monaten konnte bei allen Tieren die für eine Läsion des N. ischiadicus charakteristische Fußhaltung beobachtet werden. Die Tiere konnten die Zehen nicht mehr spreizen und setzten beim Laufen die gesamte Hinterpfote und nicht nur den Fußballen auf. Daraus resultierte eine signifikante Verschlechterung des SFI in allen experimentellen Gruppen (SZneo $-108,94 \pm 5,37$; 18-kDa $-111,01 \pm 7,16$; KV $-88,70$ & $-88,76$; HMW $-137,24$ & $-129,45$).

Vier Monate post OP hatte sich der SFI der SZneo-, 18-kDa- und KV-Gruppe weiter leicht verschlechtert (SZneo $-120,31 \pm 4,54$; 18-kDa $-123,84 \pm 3,88$; KV $-129,82$ & $-106,92$), während er sich in der HMW-Gruppe geringgradig verbesserte (HMW $-113,48$ & $-114,19$). Nach weiteren 2 Monaten war aber noch immer keine deutliche Verbesserung des SFI und somit keine funktionelle Regeneration erkennbar (SZneo $-108,03 \pm 5,47$; 18-kDa $-116,67 \pm 5,94$; KV $-118,02$ & $-130,54$; HMW $-116,84$ & $-109,33$).

Differenzen zwischen den Tiergruppen waren aufgrund der starken Streuung der Werte und der teilweise geringen Tierzahl nicht signifikant. Diese geringen Tierzahl ist auf Autotomieverhalten der Tiere zurückzuführen, das trotz des Einsatzes von Altosol-Spray und Leovet Anti Bite nicht gänzlich verhindert werden konnte.

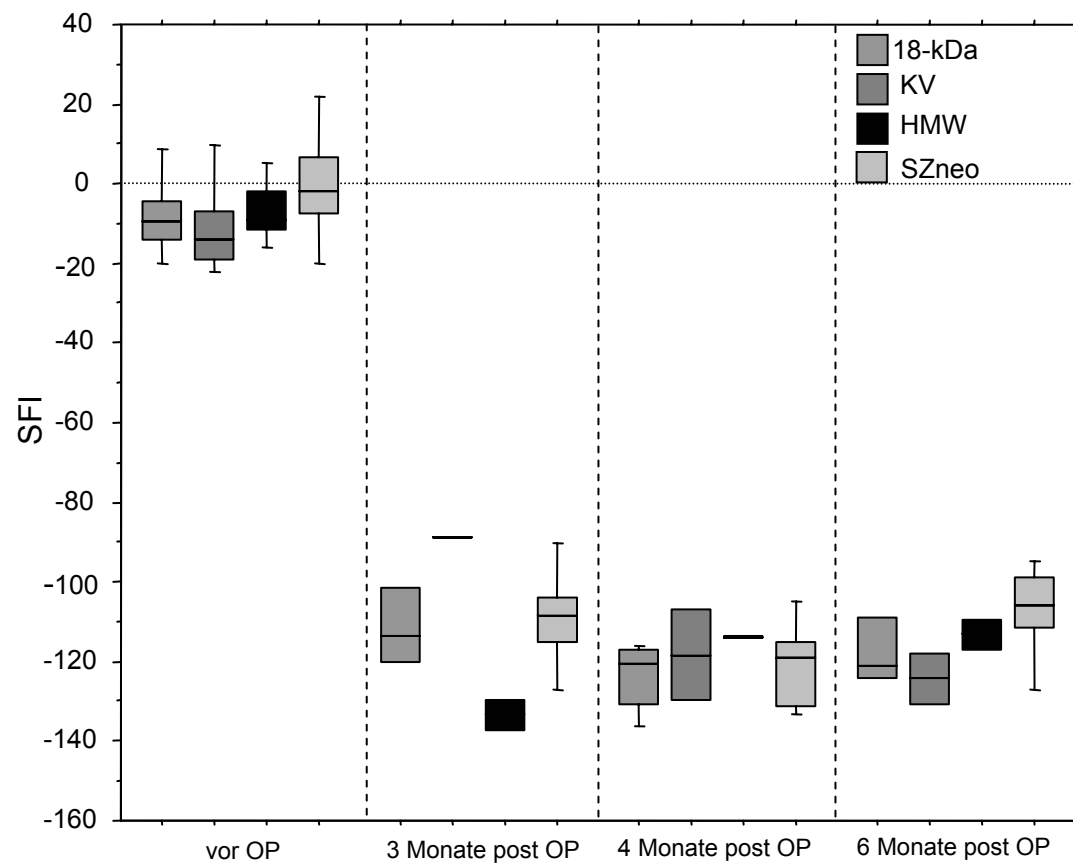


Abb. 17 Sciatic Function Index (SFI) der verschiedenen Tiergruppen vor, 3 Monate, 4 Monate und 6 Monate nach der Läsion des linken N. ischiadicus. Dargestellt sind der Median, das 10., 25., 75. und 90. Quantil. Die Daten wurden mit einer ANOVA-Varianzanalyse und dem Fisher-PLSD-Test auf Signifikanzen überprüft (* = $p < 0,05$). (**Vor OP:** SZneo $n = 9$, 18-kDa $n = 9$, KV $n = 9$, HMW $n = 9$; **3 Monate post OP:** SZneo $n = 6$, 18-kDa $n = 3$, KV $n = 2$, HMW $n = 2$; **4 Monate post OP:** SZneo $n = 7$, 18-kDa $n = 5$, KV $n = 2$, HMW $n = 2$; **6 Monate post OP:** SZneo $n = 5$, 18-kDa $n = 4$, KV $n = 2$, HMW $n = 2$)

2.2 Analyse der sensorischen Regeneration

Zur Untersuchung der Regeneration sensorischer Funktionen *in vivo* wurde das reflektorische Zurückziehen der Hinterpfote nach einem Temperaturreiz beobachtet. Es wurde nach 1, 4, 8 und 12 Wochen die Latenzzeit in sec bis zum Zurückziehen der Hinterpfoten aus dem Warmwasserbad gemessen. Die kontralaterale Seite diente als Kontrolle.

Eine Woche nach der Durchtrennung des Nerven und dem Einsetzen der Implantate war die Latenzzeit bis zum Zurückziehen der Hinterpfote aus dem 50°C heißen Wasserbad in allen Tiergruppen auf der läsionierten Seite signifikant länger als auf der Kontrollseite (läsionierte Pfote: SZneo $2,67 \pm 0,33$; 18-kDa $3,56 \pm 0,50$; KV $3,13 \pm 0,48$; HMW $3,13 \pm 0,35$; Kontroll-Pfote: SZneo $1,56 \pm 0,34$; 18-kDa $1,44 \pm 0,18$; KV $1,25 \pm 0,16$; HMW $1,00 \pm 0,00$) (Abb. 18A). Nach 4 Wochen war das Zurückziehen der läsionierten Hinterpfote in der HMW-Gruppe aufgrund der angestiegenen Reaktionszeiten der Kontrolle-Pfote nicht mehr signifikant verlangsamt (läsionierte Pfote $2,40 \pm 0,24$; Kontroll-Pfote $1,80 \pm 0,12$). Die Tiere der SZneo-, 18-kDa- und KV-Gruppe wiesen noch signifikant verlängerte Latenzzeiten der läsionierten Pfote im Vergleich zur Kontroll-Pfote auf (Läsionierte Pfote: SZneo $3,56 \pm 0,34$; 18-kDa $3,88 \pm 0,30$; KV $3,50 \pm 0,465$; Kontroll-Pfote: SZneo $1,33 \pm 0,17$; 18-kDa $1,38 \pm 0,18$; KV $1,25 \pm 0,25$) (Abb. 18B). Vergleich man nach 4 Wochen die HMW-Gruppe mit den anderen Tiergruppen und nahm als Kontrolle den Mittelwert der Latenzzeiten aller Kontrollpfoten, zeigte die HMW-Gruppe eine signifikant schnellere Reaktion der läsionierten Pfote als die anderen Tiergruppen. Allerdings war die Latenzzeit immer noch signifikant länger als die Latenzzeit der Kontrollseite (Abb. 18D). Nach 12 Wochen war in allen Gruppen, außer der SZneo-Gruppe, die Latenzzeit der läsionierten Pfote auf das Niveau der Kontrollseite abgesunken (Läsionierte Pfote: SZneo $3,33 \pm 0,56$; 18-kDa $1,67 \pm 0,33$; KV $2,00 \pm 0,00$; HMW $2,00 \pm 0,00$; Kontroll-Pfote: SZneo $1,55 \pm 0,22$; 18-kDa $1,00 \pm 0,00$; KV $2,00 \pm 0,00$; HMW $2,00 \pm 0,00$) (Abb. 18C). Auch in diesem Teil der Studie spiegelte sich das Autotomieverhalten teilweise in einer geringen Tierzahl wieder, da Tiere mit einer verletzten Hinterpfote vom Versuch ausgeschlossen wurden.

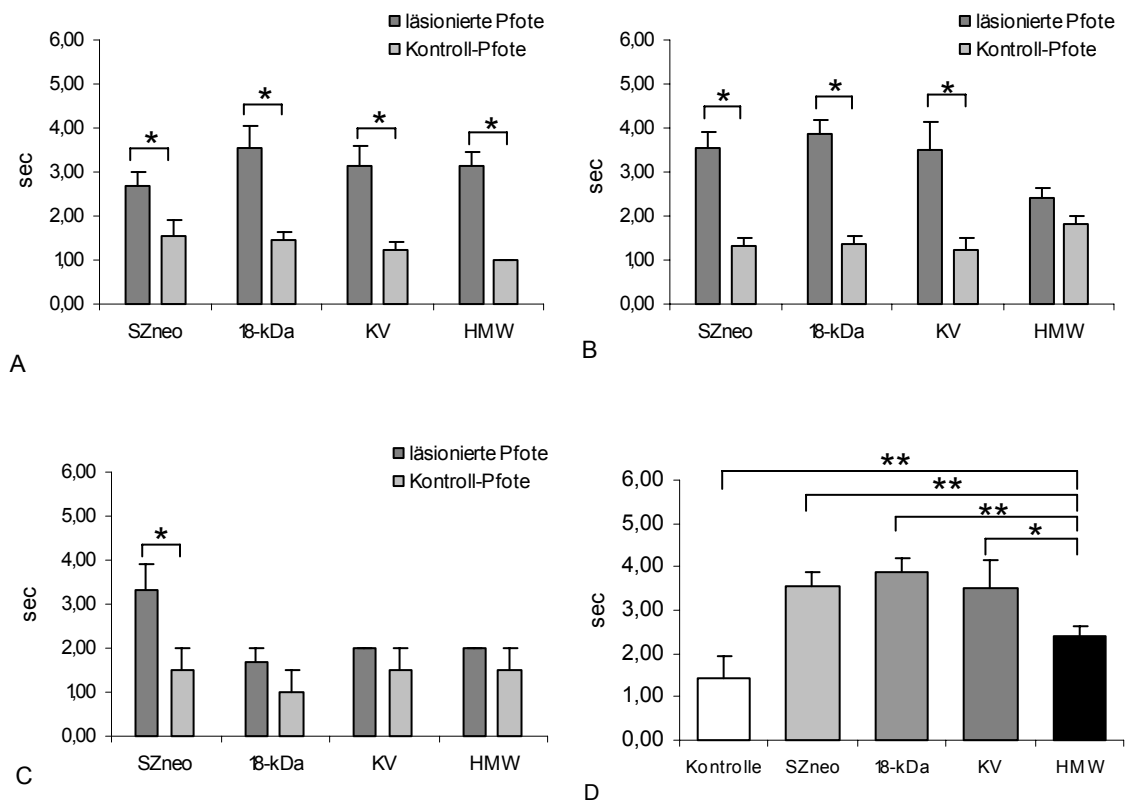


Abb. 18 Latenzzeiten des Withdrawal-Tests nach 1 (A), 4 (B) und 12 (C) Wochen. Verglichen wurden die läsionierte linke Hinterpfote und die intakte rechte Hinterpfote innerhalb der Tiergruppen. (D) zeigt die Latenzzeiten der läsionierten Hinterpfote der einzelnen Tiergruppen verglichen mit der Kontrolle, zusammengefasst aus allen Tiergruppen, nach 4 Wochen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die Daten wurden mit dem t-Test (A-C) und einer ANOVA-Varianzanalyse und dem Fisher-PLSD post hoc Test (D) auf Signifikanzen geprüft (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$). (**1 Woche:** SZneo $n = 9$, 18-kDa $n = 9$, KV $n = 9$, HMW $n = 9$; **4 Wochen:** SZneo $n = 9$, 18-kDa $n = 8$, KV $n = 4$, HMW $n = 5$; **12 Wochen:** SZneo $n = 6$, 18-kDa $n = 3$, KV $n = 2$, HMW $n = 2$; zusammengefasste Kontrolle $n = 26$)

2.3 Qualitative Analyse des Regenerationserfolges

2.3.1 Retrograde Markierung an der Regeneration beteiligter Neurone mit DiI

Zur Differenzierung der an der Regeneration beteiligten Neurone wurde mit dem retrograd transportierten Farbstoff DiI gearbeitet. Die Markierung der Neurone erfolgte 6 Monate nach der Implantation der unterschiedlich befüllten Silikonröhrchen und nur in Tieren mit einem regenerierten Gewebekabel. Es wurden Cryoschnitte des entsprechenden Rückenmarksegments und der entsprechenden DRGs angefertigt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Die in den DRGs lokalisierten Perikarien der sensorischen Fasern mit ihren relativ großen Zellkernen waren gut zu erkennen und die Anzahl markierter Zellen konnte sicher bestimmt werden (Abb. 19C). Die retrograd markierten Motoneurone im Vorderhorn des Rückenmarks waren ebenfalls gut erkennbar und leicht auszuzählen (Abb. 19D).

In allen Tiergruppen konnten markierte sensorische Neurone gefunden und deren prozentualer Anteil an der Gesamtneuronenzahl berechnet werden. Die meisten markierten Zellen in den DRGs konnten in der HMW-Gruppe ($49,3\% \pm 7,8\%$) gezählt werden. In der 18-kDa-Gruppe waren etwas weniger Zellen markiert ($46,9\% \pm 5,7\%$). Beide Tiergruppen wiesen signifikant mehr markierte sensorische Neurone auf als die DRGs aus der SZneo-Gruppe ($36,3\% \pm 3,6\%$). Die Anzahl der markierten Neurone der DRGs der KV-Gruppe lag mit $41,7\% \pm 8,1\%$ zwischen der HMW- und der 18-kDa-Gruppe (Abb. 19A).

Die Anzahl der markierten Motoneurone wurde in jedem 5. Schnitt bestimmt und anschließend auf die gesamte Schnitzzahl interpoliert (Abb. 19B). In der SZneo- und 18-kDa-Gruppe waren mit $201,77 \pm 201,67$ (SZneo) und $240,0 \pm 97,36$ (18-kDa) annähernd gleich viele Neurone markiert. In der KV- und HMW-Gruppe konnten keine markierten sensorischen Neurone gefunden werden.

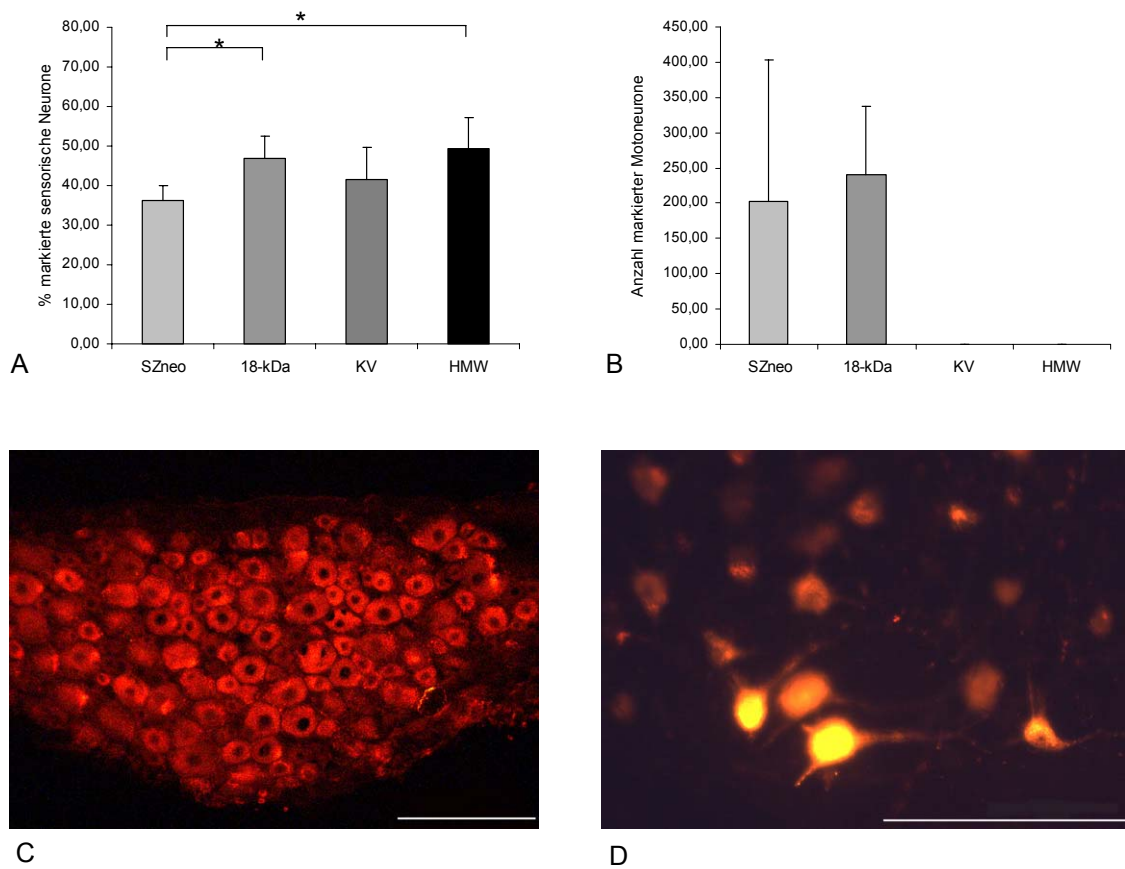


Abb. 19 Prozentsualer Anteil markierter sensorischer Neurone in den DRGs L4-L6 (A, C) und Anzahl markierter Motoneurone im Rückenmark (B,D). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die Daten wurden mit dem Students-t-Test (A) und dem Kruskal-Wallis-Test (B) auf Signifikanzen geprüft (* = $p < 0,05$). Bei (A) errechnet sich der Mittelwert und SEM aus den Mittelwerten der drei entnommenen DRGs pro Tier. ((A) Szneo $n = 9$, 18-kDa $n = 12$, KV $n = 6$, HMW $n = 6$, (B) Szneo $n = 3$, 18-kDa $n = 4$, KV $n = 2$, HMW $n = 2$) (Balken 200 μm)

2.3.2 Elektrophysiologische Messungen

Um die Regeneration der motorischen Nervenfasern und die Reinnervation der nachgeschalteten Muskeln zu analysieren, wurden 6 Monate nach Implantation elektrophysiologische Tests durchgeführt. Diese Tests wurden nur an Tieren vorgenommen, die in den implantierten Silikonröhrchen durchgehende regenerierte Gewebekabel aufwiesen. Die Tiere wurden narkotisiert, der linke N. ischiadicus freigelegt und dieser proximal und distal des Silikonröhrchens stimuliert und evozierte Potentiale am M. gastrocnemius abgeleitet und die Nervenleitgeschwindigkeit in m/sec bestimmt. Die kontralaterale Seite diente als Kontrolle.

Deutlich sind die Unterschiede bzgl. der Latenzzeiten und der Amplitude zwischen dem abgeleiteten EMG des N. ischiadicus der Kontrollseite (Abb. 20A) und einem exemplarischen EMG des N. ischiadicus nach Einsetzen des Implantates (Abb. 20B) zu sehen. Im EMG der läsionierten Seite sind die Stimulation proximal und distal des Silikonröhrchens gekennzeichnet. Es konnten nur in der SZneo- und 18-kDa-Gruppe MAPs aufgezeichnet und die mittleren Latenzzeiten sowie die Nervenleitgeschwindigkeiten berechnet werden.

Zum Auslösen eines MAP wurde am regenerierenden Nerv eine höhere Reizintensität benötigt. Des Weiteren war die Differenz der Amplituden der MAPs nach Regeneration (SZneo: proximal $6,77 \text{ mV} \pm 7,77 \text{ mV}$; distal $5,64 \text{ mV} \pm 5,66 \text{ mV}$; 18-kDa: proximal $7,57 \text{ mV} \pm 5,59 \text{ mV}$; distal $8,50 \text{ mV} \pm 4,89 \text{ mV}$) weniger ausgeprägt als auf der Kontrollseite ($56,64 \text{ mV} \pm 13,88 \text{ mV}$). Die Latenzzeiten, bis es zu einem evozierten Potential kam, waren im Mittel auf der Kontrollseite ($1,27 \text{ ms} \pm 0,24 \text{ ms}$) wesentlich kürzer als auf der beeinträchtigten Seite (SZneo: proximal $6,60 \text{ ms} \pm 5,81 \text{ ms}$; distal $2,83 \text{ ms} \pm 1,27 \text{ ms}$; 18-kDa: proximal $4,78 \text{ ms} \pm 1,68 \text{ ms}$; distal $2,35 \text{ ms} \pm 0,52 \text{ ms}$). Die Nervenleitgeschwindigkeiten der SZneo- und der 18-kDa-Gruppe waren annähernd gleich (SZneo $12,53 \text{ m/sec} \pm 5,33 \text{ m/sec}$; 18-kDa $10,97 \text{ m/sec} \pm 3,83 \text{ m/sec}$). In der KV- und HMW-Gruppe konnte selbst bei hoher Reizintensität kein MAP evoziert werden (Abb. 20C).

Die Phasenanzahl der MAPs der läsionierten Seite unterscheidet sich nicht von der der Kontrollseite. Auf der Kontrollseite betrug die Anzahl der Phasen 2-4, auf der läsionierten Seite lag sie zwischen 3-5 Phasen.

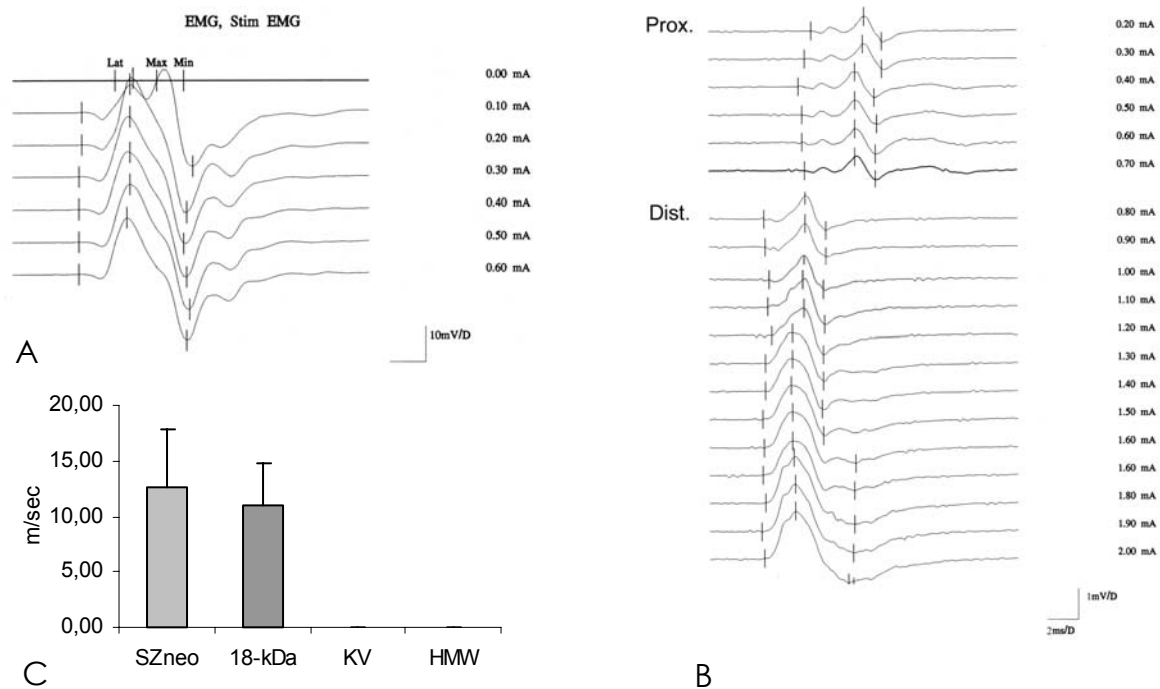


Abb. 20 Elektromyogramm (EMG) nach Stimulation eines intakten (A) und eines regenerierten (B) N. ischiadicus 6 Monate nach Implantation der Silikonröhrchen. In (B) sind Stimulationen distal und proximal des Implantates gekennzeichnet. (C) Nervenleitgeschwindigkeit innerhalb des implantierten Röhrchens. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die Daten wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test auf Signifikanzen geprüft (* = $p < 0,05$). (SZneo $n = 3$, 18-kDa $n = 4$, KV $n = 2$, HMW $n = 2$)

2.4 Quantitative Analyse des Regenerationserfolges

2.4.1 Anzahl regenerierter Kabel mit durchgehend myelinisierten Axonen

Nach 6 Monaten wurden die Ratten getötet und die implantierten Silikonröhrchen entnommen, das regenerierte Gewebe histologisch aufgearbeitet und Semidünnschnitte angefertigt. In der 6-Monats-Gruppe wurde die Anzahl regenerierter Kabel mit myelinisierten Axonen, die bis zum distalen Stumpf (+15,0 mm) gewachsen waren, bestimmt (Abb. 21). In der SZneo-Gruppe waren zu diesem Zeitpunkt bei 3 von 9 Tieren Gewebekabel regeneriert, die bei 2 Tieren (66%) bis zum distalen Stumpf gewachsen waren. Signifikant weniger myelinisierte Axone hatten in der 18-kDa-Gruppe (40%) den distalen Stumpf erreicht. In der KV- und HMW-Gruppe konnten bei keinem Tier myelinisierte Fasern im distalen Stumpf gefunden werden.

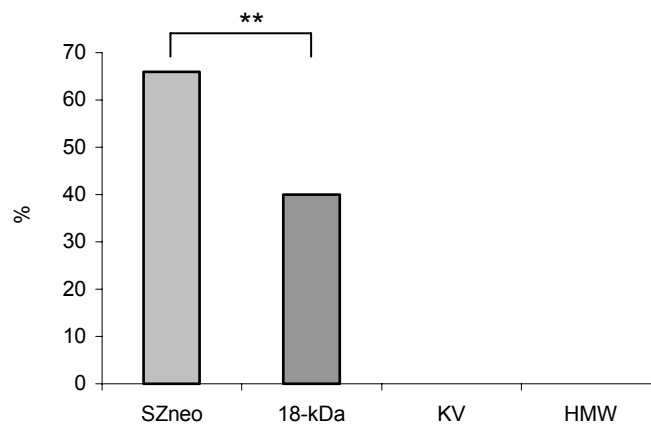


Abb. 21 Prozentualer Anteil an regenerierten Gewebekabeln mit myelinisierten Axonen, die über die gesamte Distanz des Implantates bis +15,0 mm gewachsen waren. Die Daten wurden mit dem Chi-Quadrat-Test auf Signifikanzen geprüft (** = $p < 0,01$). (SZneo $n = 3$, 18-kDa $n = 5$, KV $n = 2$, HMW $n = 2$)

2.4.2 Anzahl, Durchmesser und g-ratio regenerierter myelinisierter Axone

Nach 6 Monaten wurden in der KV- und HMW-Gruppe im distalen Bereich der regenerierten Gewebekabel (+15,0 mm) keine myelinisierten Axone gefunden (Abb. 21). Daher wurden zusätzliche Semidünnschnitte bei +7,0 mm angefertigt und morphometrisch ausgewertet. Es wurden die absolute Anzahl (Abb. 22A) regenerierter myelinisierter Axone, deren Durchmesser (Abb. 22B) und g-ratio (Abb. 22C) bestimmt.

Die meisten myelinisierten Axone wurden in der SZneo-Gruppe (2.501 ± 435) und 18-kDa-Gruppe (1.822 ± 312) gefunden. Die Anzahl regenerierter myelinisierter Axone lag in der KV-Gruppe ($n = 2$: 299 & 173) und HMW-Gruppe ($n = 2$: 111 & 54) deutlich unter den Werten der SZneo- und 18-kDa-Gruppe, allerdings waren die Unterschiede aufgrund der geringen Tierzahl nicht signifikant. Nach 6 Monaten waren im Vergleich zu der 3-Monats-Gruppe mit durchschnittlich insgesamt 1.160 ± 595 myelinisierten Axonen etwas mehr Fasern regeneriert als nach 3 Monaten (791 ± 225). Der Axondurchmesser der regenerierten Fasern lag durchschnittlich bei $2,53 \mu\text{m} \pm 0,13 \mu\text{m}$ und war somit etwas geringer als nach 3 Monaten ($2,77 \mu\text{m} \pm 0,06 \mu\text{m}$). Die Durchmesser der Axone zwischen den einzelnen Tiergruppen unterschieden sich nicht signifikant. (SZneo $2,32 \mu\text{m} \pm 0,30 \mu\text{m}$, 18-kDa $2,67 \mu\text{m} \pm 0,14 \mu\text{m}$, KV $2,37 \mu\text{m}$ & $3,32 \mu\text{m}$, HMW $2,25 \mu\text{m}$ & $2,35 \mu\text{m}$) (Abb. 22B).

Die g-ratios der verschiedenen Tiergruppen unterschieden sich nach 6 Monaten nicht voneinander (Abb. 22C). Vergleich man allerdings den mittleren g-ratio aller Gruppen am Schnittpunkt +7,0 mm nach 3 Monaten ($0,73 \pm 0,003$) mit dem mittleren g-ratio aller Gruppen nach 6 Monaten ($0,693 \pm 0,011$), wurde nach 6 Monaten ein signifikant besserer g-ratio beobachtet, die Myelinisierung war somit nach 6 Monaten besser. Die Betrachtung der g-ratios innerhalb jeder Tiergruppen konnte in der SZneo- (3 Monate: $0,73 \pm 0,008$; 6 Monate: $0,670 \pm 0,015$), 18-kDa- (3 Monate: $0,73 \pm 0,017$; 6 Monate: $0,700 \pm 0,011$) und KV-Gruppe (3 Monate: $0,73 \pm 0,006$; 6 Monate: $n = 2$: 0,67 & 0,69) eine Verbesserung des g-ratio und in der HMW-Gruppe (3 Monate: $0,74 \pm 0,005$; 6 Monate: $n = 2$: 0,69 & 0,75) einen annähernd gleichen mittleren g-ratio zeigen.

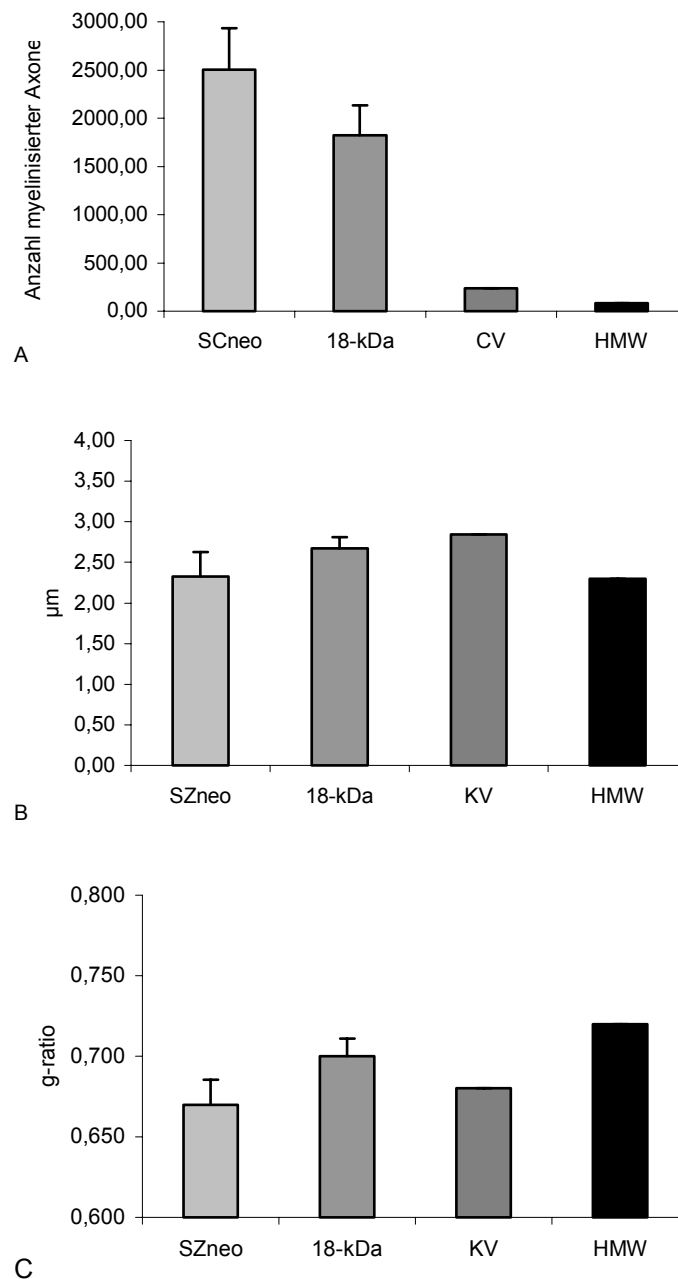


Abb. 22 Anzahl (A), Durchmesser (B) und g-ratio (C) der regenerierten myelinisierten Axone bei +7,0 mm. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. Die Daten wurden mit dem Students-t-Test (B, C) und dem Mann-Whitney-U-Test (A) auf Signifikanzen geprüft (* = $p < 0,05$). (SZneo $n = 3$, 18-kDa $n = 4$, KV $n = 2$, HMW $n = 2$)

2.5 Ultrastrukturelle Analyse der Regenerate

Nachdem in der HMW-Gruppe nur die Perikarien der sensorischen Fasern und keine Motoneurone markiert waren, keine MAPs abgeleitet werden konnten und im distalen Bereich der Gewebekabel (+15,0 mm) keine myelinisierten Fasern vorhanden waren, sollte auf ultrastruktureller Ebene geklärt werden, ob nicht-myelinisierte Fasern vorhanden sind.

Daher wurden zusätzlich zur morphometrischen Untersuchung der Regenerate im distalen Bereich (+15,0 mm) aller Tiergruppen Ultradünnschnitte angefertigt, um auf ultrastruktureller Ebene zu überprüfen, wie das regenerierte Gewebe beschaffen war.

Das Ergebnis der Analyse war sehr überraschend. In der SZneo-Gruppe konnten, wie nach der morphometrischen Auswertung zu erwarten war, gut myelinisierte Fasern, Schwann-Zellen sowie Bindegewebe nachgewiesen werden (Abb. 23A). Die Semidünnschnitte der KV-Gruppen zeigten keine myelinisierten Axone. Unter dem Elektronenmikroskop wurden nur einige wenige nicht-myelinisierte Fasern und wenige Fasern, die eine beginnende Myelinisierung zeigten, sowie größten Teils Bindegewebe gefunden (Abb. 23C).

In der 18-kDa-Gruppe zeigten sich neben den myelinisierten Axonen, nicht-myelinisierten Axonen und bindegewebigen Strukturen in einigen Bereichen auch eine große Anzahl von degenerierten Fasern. Deutlich sind die zwiebelschalenartig, locker angeordneten Myelinringe erkennbar. Auch in dieser Gruppe waren einige Fasern zu erkennen, bei denen die Myelinisierung gerade begonnen hatte (Abb. 23B).

In der HMW-Gruppe waren wie in der KV-Gruppe auch auf ultrastruktureller Ebene keine myelinisierten Axone erkennbar. Vereinzelt konnten nicht-myelinisierte Axone und, wie schon in der 18-kDa-Gruppe beschrieben, degenerierte Axone lokalisiert werden (Abb. 23D).

Die degenerierten Fasern konnten ausschließlich in der 18-kDa- und HMW-Gruppe nachgewiesen werden, wobei sie in der 18-kDa-Gruppe sehr viel prominenter waren als in der HMW-Gruppe.

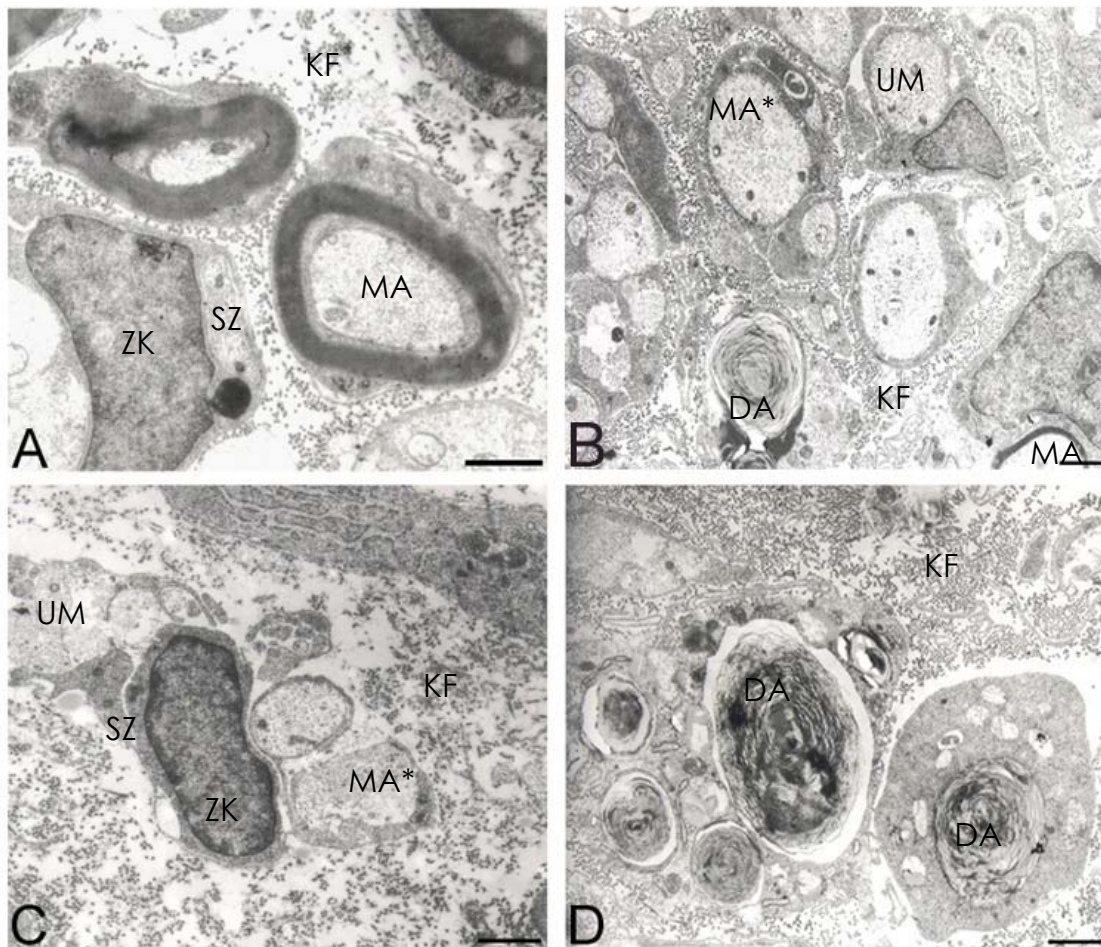


Abb. 23 Elektronenmikroskopische Aufnahmen aus Regeneraten der verschiedenen Tiergruppen (A) SZneo, (B) 18-kDa, (C) KV und (D) HMW aus dem Bereich +15,0 mm mit Darstellung myelinisierter Axone (MA), sowie nicht-myelinisierter Axone (UM), Schwann-Zellen (SZ) und deren Zellkern (ZK), dem Endoneurium (Endo), kollagenen Fasern (KF), degenerierten Axonen (DA) und Axonen, bei denen die Myelinisierung gerade begonnen hatte (MA*) (Balken 2 μ m).

IV. Diskussion

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss der 18-kDa-Isoform und der HMW-Isoformen des FGF-2 auf die Nervenregeneration nach großem Substanzverlust zu beurteilen. Zu diesem Zweck wurden Schwann-Zellen, welche die 18-kDa-FGF-2 bzw. HMW-FGF-2-Isoformen überexprimierten, in einem Silikonröhrchen zwischen den proximalen und distalen Stumpf des durchtrennten N. ischiadicus adulte Ratten implantiert. Im Mittelpunkt des Interesses standen funktionelle Tests und qualitative und quantitative Analysen im Hinblick auf eine mögliche Nervenregeneration über große Distanzen durch die Zugabe der verschiedenen FGF-2-Isoformen. Es wurde untersucht, ob die verschiedenen FGF-2-Isoformen die Nervenregeneration beeinflussen und ob die FGF-2-Isoformen unterschiedliche Effekte haben. Nachfolgend werden die erarbeiteten Ergebnisse diskutiert.

1. Tiermodell

Die Ratte ist für Studien zur peripheren Nervenregeneration ein weit verbreitetes Modell (CARR *et al.*, 1992; IJHEMA-PAASSEN *et al.*, 2004; STRASBERG *et al.*, 1999). Ein häufiges Problem, das im Rahmen solcher Studien auftreten kann, ist die Autophagie der denervierten Gliedmassen, ein Phänomen, das auch als Autotomie bezeichnet wird und dessen Ursache wahrscheinlich im Phantomschmerz der betroffenen Extremität begründet ist (AL-ADAWI *et al.*, 2002). Um dies zu verhindern, ist ein wichtiges Versuchs-kriterium die Auswahl des richtigen Rattenstammes, da die verschiedenen Rattenstämme ein unterschiedlich ausgeprägtes Autotomieverhalten zeigen (CARR *et al.*, 1992). So wurde im Auszuchtstamm Sprague Dawley nach Durchtrennung des N. ischiadicus ohne Reanastomose der Nervenstümpfe eine Autotomierate von 100 % und im Falle einer Reanastomose eine Autotomierate von 70 % beschrieben. Dieser Rattenstamm wies im Vergleich zu allen anderen Stämmen die höchste Autotomierate auf. Der mittlere Beginn des Autotomieverhaltens lag bei 3,5

Wochen nach Nervendurchtrennung (CARR *et al.*, 1992). WEBER *et al.* (1993) konnten zeigen, dass die Autotomie rate bei weiblichen Tieren sehr viel geringer als bei männlichen Tieren ist.

Ratten anderer Stämme sind für Studien am PNS besonders bei funktionellen Studien aufgrund des sehr viel geringeren Autotomieverhaltens besser geeignet (Lewis Ratten 0 % Autotomieverhalten) (CARR *et al.*, 1992).

In der Literatur werden weitere Möglichkeiten zur Unterbindung von Autotomieverhalten, wie z.B. eine angereicherte Käfigumgebung („enriched environment“) oder eine pharmakologische Behandlung beschrieben (AL-ADAWI *et al.*, 2002; FERIA *et al.*, 1993; MEEK *et al.*, 2004).

Da eine vorangegangene Studie über 4 Wochen zur peripheren Nervenregeneration in dieser Arbeitsgruppe mit weiblichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt wurde und auch die neonatalen implantierten Schwann-Zellen aus Sprague-Dawley-Ratten stammten, wurde in dieser Studie trotz der bekannten Probleme bzgl. des Autotomieverhaltens weiter mit diesem Stamm gearbeitet.

Um das Autotomieverhalten post OP zu unterbinden, wurden die Ratten in mit Zellstoff und Papierrollen angereicherten Käfigen untergebracht und ihnen zusätzlich alle 2 Tage die Füße mit Altosol-Spray oder Leovet Anti-Bite-Spray eingesprüht, da diese Substanzen extreme Bitterstoffe enthalten und so das Anfressen der Hinterextremitäten verhindern sollten (SPOREL-OZAKAT *et al.*, 1991). Die Tiere zeigten trotz aller Bemühungen Autotomieverhalten, daher reduzierte sich die Tierzahl in den Verhaltenstests im Laufe des Versuchs. Zum einen war es ethisch nicht vertretbar, die wunden Füße anzufärben oder in das Warmwasserbad zu tauchen und zum anderen war es nicht möglich, für eine Ratte mit fehlenden Zehengliedern der Hinterpfote, den SFI zu bestimmen.

2. Implantat

In dieser Studie wurden als Implantate Silikonröhrchen verwendet. Sie beeinflussen den Regenerationsprozess nicht und können über einen längeren Zeitraum eingesetzt werden, allerdings bergen sie ein erhöhtes Infektionsrisiko

und können zu chronischen Entzündungen führen (AEBISCHER *et al.*, 1989; FINE *et al.*, 2002; GUENARD *et al.*, 1992; SCHMIDT & LEACH, 2003; ZHAO *et al.*, 1997). Entzündungserscheinungen wurden in dieser Studie nicht beobachtet. Des Weiteren sind für eine erfolgreiche Regeneration physikalische Parameter, wie z.B. der Innendurchmesser und die Wanddicke des Implantates, von Bedeutung (BUTI *et al.*, 1996). Der ideale Innendurchmesser eines Interponates wird mit dem Faktor 2,5 des Nervendurchmessers angegeben (BUTI *et al.*, 1996). Der Durchmesser eines gesunden N. ischiadicus der adulten Ratte beträgt ca. 0,705 mm (JENQ *et al.*, 1986). Daraus resultiert ein idealer Innendurchmesser von ca. 1,76 mm. Somit ist der in dieser Studie gewählte Innendurchmesser von 1,5 mm etwas zu klein, was möglicherweise im Laufe des Regenerationsprozesses die Regeneration beeinflusst hat. Es ist bekannt, dass ein zu kleiner Innendurchmesser zu einer verminderten Durchblutung des regenerierenden Gewebes und daraus resultierend zu einer verminderten Anzahl regenerierter myelinisierter Axone führen kann (BUTI *et al.*, 1996). Außerdem kann es infolge der fehlenden Permeabilität des Silikons zu einer ansteigenden Konzentration der bei der Nervenregeneration freigesetzten Faktoren, wie z.B. NGF, BDNF und NT-4, kommen, was sich sowohl positiv als auch negativ auf das Versuchsergebnis auswirken kann (BUTI *et al.*, 1996).

Als extrazelluläre Matrix wurde wachstumsfaktorreduziertes Matrigel verwendet, welches positive Einflüsse auf die Vaskularisierung regenerierenden Gewebes und die Nervenregeneration haben kann (HOBSON *et al.*, 2000; NAVARRO *et al.*, 2003) und so eine geeignete Matrix zur Zellimplantation im PNS darstellt. Durch die Verwendung von wachstumsfaktorreduziertem Matrigel konnte eine Beeinflussung der Untersuchung der Effekte der FGF-2-Isoformen durch die Implantationsmatrix ausgeschlossen werden.

3. Funktionelle Regeneration

Da es im Rahmen peripherer Nervenverletzungen durch die fehlende Innervation der Zielgebiete zum Funktionsverlust der betroffenen Muskulatur und zu

Sensibilitätsausfällen der betroffenen Hautareale kommt, kann anhand des Ausmaßes solcher Störungen der Grad einer Beeinträchtigung des betroffenen Nerven beurteilt werden. Im Tierversuch gängige Tests zur Überprüfung der motorischen und sensorischen Regeneration nach einer Nervenläsion sind die Laufmusteranalyse mit Berechnung des Sciatic Function Index (SFI) und der Withdrawal-Test (CRAWLEY, 2000; DIJKSTRA *et al.*, 2000).

Die Laufmusteranalyse und die Berechnung des SFI ist allerdings kein besonders sensibler Test. Der SFI kann durch das Verhalten der Tiere während der Laufmusterabnahme beeinflusst werden. So kann sich das Laufmuster allein dadurch verändern, dass das Tier während des Laufens gestört oder abgelenkt wird. Richtet sich das Tier auf, liegt sein Körpergewicht auf den Hinterpfoten und verändert die messbaren Abstände zwischen den Zehen (VAREJAO *et al.*, 2001). Außerdem ist ein weiterer limitierender Faktor das Autotomieverhalten der Tiere. Auch der Withdrawal-Test ist aufgrund der in 3.2 erläuterten Problematik bzgl. der nicht-gezielten Reizung der Hinterfußsohle nicht sehr sensitiv.

3.1 Motorische Regeneration

Die Analyse der Laufmuster und die Berechnung des SFI ist eine gängige Methode, um die motorische Funktion des N. ischiadicus nicht-invasiv zu bestimmen (VAREJAO *et al.*, 2001). Ein wichtiger, nicht zu vernachlässigender limitierender Faktor der Laufmusteranalyse ist allerdings das bereits erwähnte Problem der Autotomie. Da von Ratten mit verletzten Füßen keine Laufmuster genommen werden konnten und gerade bei dem Stamm Sprague-Dawley das Autotomieverhalten besonders hoch ist, sank die Tierzahl zur Analyse der motorischen Funktion im Laufe des Versuchs, eine statistische Aussage war in einigen Versuchsgruppen nicht mehr möglich.

Die Analyse der Laufmuster und die Berechnung des SFI ließen in den unterschiedlichen Implantationsgruppen weder nach 3- noch nach 6-monatiger Beobachtungsdauer eine Wiederherstellung der motorischen Funktionen des läsionierten N. ischiadicus erkennen. Vor der Durchtrennung des N. ischiadicus

und der Implantation der unterschiedlich befüllten Silikonröhrchen betrug der SFI in allen Gruppen annähernd 0. Nach der OP sank der durchschnittliche SFI aller Gruppen auf ca. -100 ab, was auf einen totalen Funktionsverlust des N. ischiadicus hindeutete und so erwartet wurde. Eine Rückkehr der funktionellen Motorik blieb jedoch auch nach 6 Monaten aus.

Diese Ergebnisse entsprechen den Daten anderer Arbeitsgruppen, die mit einem ähnlichen Tiermodell zur peripheren Nervenregeneration über große Distanzen arbeiteten (ANSSELIN *et al.*, 1997; DIJKSTRA *et al.*, 2000; MEEK *et al.*, 1999a). Dem derzeitigen Stand der Literatur ist zu entnehmen, dass es im Falle einer Nervendurchtrennung nie zu einer kompletten Wiederherstellung der motorischen Funktionen kommt. Alle Arbeitsgruppen, die am Modell des N. ischiadicus der Ratte oder der Maus arbeiteten, konnten bestenfalls eine Regeneration des SFI von ca. 25 % - 65 % der ursprünglichen Werte erreichen (EVANS *et al.*, 1995; HEBEBRAND *et al.*, 1997; MEEK M. F. *et al.*, 1997; WEBER *et al.*, 1996). Die Gründe hierfür können vielfältig sein. Zum einen besteht die Möglichkeit der fehlenden Reinnervation der Muskulatur. Dies kann durch ein unzureichendes Auswachsen der regenerierten Axone und somit einer weiterhin bestehenden Lücke zwischen den Nervenstümpfen oder der Bildung eines Neuroms bedingt sein. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass es durch ein Einwachsen der erfolgreich regenerierten Axone in ein anderes Zielgebiet zur Fehlinnervation der nachgeschalteten Muskulatur kommt. Des Weiteren können beginnende atrophische Prozesse der Muskulatur die Funktionstüchtigkeit der Muskeln beeinträchtigen (GUNTINAS-LICHIUS *et al.*, 2005; MEEK *et al.*, 1997; MEEK *et al.*, 1999b; VALERO-CABRE & NAVARRO, 2002; VALERO-CABRE *et al.*, 2001). Die mögliche Fehlinnervation der Hinterpfoten- und Zehenmuskulatur würde erklären, warum es in dieser Studie selbst bei den Tieren, bei denen nach 6 Monaten MAPs im proximal gelegenen Wadenmuskel, M. gastrocnemius, abgeleitet werden konnten, keine Anzeichen für eine wiederhergestellte Funktion der weiter distal gelegenen Hinterpfoten- und Zehenmuskulatur gab.

Es gibt zurzeit verschiedene Ansatzpunkte zur Steigerung der funktionellen Regeneration nach einer Nervenläsion. So sollen sich regelmäßiges körperliches Training oder eine zur freien Bewegung anregende Umgebung („enriched

environment“) positiv auf die Regeneration der Motorik auswirken. Diese regenerationsfördernden Wirkungen werden zurzeit noch widersprüchlich diskutiert. So konnten VAN MEETEREN *et al.* (1997a) an Ratten nach einer Quetschung des N. ischiadicus zeigen, dass sich bei erhaltener Kontinuität der Axone durch Training (die Wasserflasche war so am Käfig befestigt, dass sich die Tiere zum Trinken aufrichten mussten) die funktionelle Regeneration im Vergleich zu einer untrainierten Kontrollgruppe verbessern ließ. Gegenteilige Ergebnisse zeigten MEEK *et al.* (2004), die bei Ratten nach einer Axotomie und anschließender Implantation von autologem Nervengewebe, denen eine angereicherte Käfigumgebung geboten wurde, keine verbesserte funktionelle Regeneration feststellten.

Aus der Literatur geht hervor, dass es wichtig ist, das richtige Trainingsmaß zu finden, denn zuviel oder zu wenig Training hat einen gegenteiligen Effekt und wirkt sich eher nachteilig auf die Regeneration aus. Weiterhin ist es wichtig, dass das Training für die Tiere keinen Stress bedeutet, denn dieser wiederum kann sich auch negativ auf die funktionelle Regeneration auswirken. Man muss also zwischen freiwilligem und erzwungenem Training unterscheiden (VAN MEETEREN *et al.*, 1997a; VAN MEETEREN *et al.*, 1997b).

Die Ursache für die verbesserte Funktion der Motorik durch Training oder eine angereicherte Umgebung soll möglicherweise in einer gesteigerten korticalen Plastizität begründet sein. Jeder Nervenzelle im Kortex ist ein rezeptives Feld auf der Hinterpfote der Ratte zugeordnet. Benachbarte rezeptive Felder korrespondieren mit benachbarten Hirnarealen und bilden so genannte Korticale Karten. Im Alter kommt es zu Störungen der Nervenzellaktivität im Kortex und zum Zerfall der korticalen Karte und dadurch zu einem eingeschränkten Laufverhalten der Ratten (DINSE & EYSEL, 2003).

Eine Studie an alten Ratten zeigte, dass diese nach Bereitstellung einer angereicherten Umgebung neue Laufstrategien, wie z. B. kleine Schritte, entwickelten und sich somit ihr Laufmuster verbesserte. Die neue Laufstrategie unterschied sich dabei aber wesentlich von der alter und junger Kontroll-Ratten. Die korticale Karte im Gehirn zeigte wieder eine ähnliche Ausdehnung wie bei einem jungen Tier, war aber nicht mehr so empfindlich. Eventuell kommt es

durch Training, oder die angereicherte Umgebung und somit der Möglichkeit zur Bewegung, zu einer korticalen Reorganisation und die Tiere können die Beeinträchtigung des beschädigten Nerven besser kompensieren (DINSE & EYSEL, 2003; LUNDBORG & ROSEN, 2003). Eine weitere Maßnahme zur Steigerung der Wiederkehr motorischer Funktionen ist die elektrische Reizung des betroffenen Nerven mittels eines Stimulators (AL-MAJED *et al.*, 2000; BRUSHART *et al.*, 2002; GORDON *et al.*, 2003).

Die angeführten Punkte zur Förderung der funktionellen motorischen Regeneration bieten die Grundlage für weitere Experimente. Man könnte also in einer nächsten Studie untersuchen, ob Transplantationsstrategien zusammen mit einem speziellen Training, einer angereicherten Käfigumgebung oder elektrischer Stimulation in der Lage sind, die Regeneration der funktionellen Motorik zu fördern.

3.2 Sensorische Regeneration

Die Wiederherstellung der Hautsensibilität (sensorische Regeneration) wurde anhand des reflektorischen Zurückziehens der Hinterpfoten nach einem Temperaturreiz (Withdrawal-Test) bestimmt. Es wurde die Latenzzeit in Sekunden bestimmt, bis die Tiere auf den Reiz reagierten.

Eine Woche nach der OP zeigten alle Tiergruppen eine signifikant längere Latenzzeit der läsionierten Hinterpfote im Vergleich zur Kontrollpfote. Erste Anzeichen funktioneller sensorischer Regeneration traten 4 Wochen post OP in der HMW-Gruppe auf. Die Latenzzeit der HMW-Gruppe war im Vergleich zu der in den anderen Tiergruppen signifikant verkürzt, allerdings noch signifikant länger im Vergleich zur zusammengefassten contra-lateralen Kontrolle aller Tiergruppen. Nach 12 Wochen hatten alle Tiergruppen bis auf die SZneo-Gruppe wieder das Kontrollniveau erreicht.

Die aus der Literatur bekannte verstärkte Expression von FGF-2 in den DRGs nach einer Nervenläsion weist auf neurotrophe Funktionen von FGF-2 in sensorischen Neuronen hin (GROTHE *et al.*, 2001). Des Weiteren konnte von

MEISINGER & GROTHE (1997) gezeigt werden, dass in der Ratte nach einer Quetschung des N. ischiadicus die 18-kDa- und die HMW-FGF-2-Isoformen in den DRGs und im peripheren Nervengewebe unterschiedlich hochreguliert werden. Dabei wurde in den DRGs eine sehr viel stärkere Hochregulation von HMW-FGF-2 im Vergleich zu 18-kDa-FGF-2 nachgewiesen (MEISINGER & GROTHE; 1997). Diese Befunde und die vorliegenden Ergebnisse der retrograd markierten sensorischen Neurone in den DRGs, welche in Punkt 5 diskutiert werden, deuten auf eine Förderung der sensorischen Nervenregeneration durch die HMW-FGF-2-Isoformen hin.

Im Rahmen der hier diskutierten Studie konnte allerdings nicht abschließend geklärt werden, ob die Wiederherstellung der Temperatursensibilität ausschließlich auf die Regeneration des N. ischiadicus zurückzuführen ist. Es ist aus der Literatur bekannt, dass die Fußsohle der Ratte nicht nur von sensiblen Fasern des N. ischiadicus, sondern auch von Fasern des N. saphenus innerviert wird. Die sensiblen Endigungen des N. ischiadicus sind physiologisch an der lateralen Seite und im mittleren Bereich der Hinterpfoten lokalisiert, während der N. saphenus die mediale Kante der Pfote innerviert (DE KONING *et al.*, 1986).

Es wird diskutiert, dass nach einer Läsion des N. ischiadicus Fasern des N. saphenus in das Innervationsgebiet des N. ischiadicus einwachsen können, jedoch gehen hier die Versuchsergebnisse einzelner Arbeitsgruppen auseinander, so dass diesbezüglich keine eindeutige Aussage getroffen werden kann (DE KONING *et al.*, 1986; DERBY *et al.*, 1993).

Man muss, um einen Einfluss des N. saphenus vollkommen ausschließen zu können, diesen entweder im Zuge der OP ebenfalls durchtrennen oder versuchen, ganz gezielt nur bestimmte Punkte der Hinterpfote anzuregen. Das kann durch elektrische oder mechanische Stimulation geschehen (DIJKSTRA *et al.*, 2000; MEEK M.F. *et al.*, 1997; UDINA *et al.*, 2003). Dies erfordert allerdings den Einsatz von 2 Experimentatoren und war im Rahmen dieser Studie nicht möglich.

Beim Eintauchen der Hinterpfote in das Wasserbad wurde die gesamte Fußsohle gereizt. Ein Einfluss des N. saphenus kann also nicht ausgeschlossen werden, allerdings wäre dieser Fehler in allen Tiergruppen gleich und würde das

unterschiedliche Regenerationsverhalten der verschiedenen experimentellen Gruppen nicht erklären oder beeinflussen. Daher kann von einem echten Effekt der HMW-FGF-2-Isoformen auf die sensorische Regeneration ausgegangen werden.

4. Elektrophysiologische Messung

Zur qualitativen Beurteilung der motorischen Regeneration wurden elektrophysiologische Messungen durchgeführt. Es wurde versucht, nach Stimulation des N. ischiadicus proximal und distal des Implantates im M. gastrocnemius MAPs abzuleiten. Diese Messungen wurden nur mit der 6-Monats-Gruppe und nur mit Tieren, die ein regeneriertes Gewebekabel im Implantat aufwiesen, durchgeführt.

Die Ableitung von MAPs war nur in der SZneo- und 18-kDa-Gruppe, nicht aber in der KV- und HMW-Gruppe möglich. Die errechneten Nervenleitgeschwindigkeiten der SZneo- und 18-kDa-Gruppen unterschieden sich nicht voneinander. Vergleich man die EMGs der läsionierten Seite (Abb. 20B) mit denen der Kontrollseite (Abb. 20A), konnte auf der läsionierten Seite eine verzögerte Latenzzeit und eine verringerte Differenz zwischen der maximalen und minimalen Amplitude beobachtet werden. Weiterhin benötigte man zum Auslösen eines MAP nach Läsion eine sehr viel höhere Reizstärke als auf der Kontrollseite.

Aus der Klinik ist bekannt, dass nach Läsionen des PNS, die zum Verlust motorischer Axone führen, die Nervenleitgeschwindigkeit in den neu gebildeten Axonsprossen aufgrund geringer Myelinisierung und zu wenigen regenerierten Axonen deutlich langsamer erfolgt und daher die reinnervierten Muskelfasern später erregt werden (FU & GORDON, 1995; STÖHR & KRAUS, 2002). Diese verminderte Nervenleitgeschwindigkeit im Vergleich zu einem gesunden Nerven konnte auch auf der läsionierten Seite der hier untersuchten Tiere beobachtet werden.

Eine weitere Ursache für die verminderte Nervenleitgeschwindigkeit kann in einer Fehl- oder Polyinnervation der motorischen Endplatten begründet sein (IJKEMA-PAASSEN *et al.*, 2004). Zwar wachsen regenerierende motorische Fasern bevorzugt in motorische und sensorische Fasern in sensorische Zielgebiete ein, allerdings gelingt dies nicht immer (BRUSHART, 1993; BRUSHART, 1988; ZHAO *et al.*, 1992). Da es bei regenerierenden sensorischen Fasern häufiger zum Einwachsen in motorische Zielgebiete kommt, sind diese sensiblen Fasern möglicherweise in den Muskel eingewachsen, können dort aber keine Funktion erfüllen und blockieren stattdessen die motorischen Endplatten für motorische Fasern (BRUSHART, 1988; BRUSHART & SEILER, 1987).

Des Weiteren kann ein bevorzugtes Auswachsen bestimmter Nervenfasern erfolgt sein. Es gibt verschiedene Klassen von Nervenfasern, geordnet nach ihrer Funktion, ihrem Durchmesser, der Dicke ihrer Markscheide und ihrer Leitungsgeschwindigkeit (DUUS, 1995). Das vermehrte und schnellere Auswachsen sensorischer Nervenzellfortsätze wurde schon in der Literatur beschrieben, allerdings sind die Gründe dafür noch unklar (KAWASAKI *et al.*, 2000). So konnte gezeigt werden, dass NT-3 das Auswachsen von propriozeptiven Fasern und NT-4 das Auswachsen nozizeptiver Fasern fördert (PATEL *et al.*, 2000; PATEL *et al.*, 2003).

Außerdem sind in der Literatur unterschiedliche Effekte von neurotrophen Substanzen wie z.B. NT-3 oder NT-4 auf die Reinnervation unterschiedlicher Muskelfasertypen beschrieben (SIMON *et al.*, 2003). So fördert NT-4 die Regeneration von Typ-I-Muskelfasern, wohingegen NT-3 die Regeneration von IIB- Fasern fördert (SIMON *et al.*, 2003; STERNE *et al.*, 1997).

Der Durchmesser der myelinisierten Axone des gesunden N. ischiadicus schwankt zwischen 1,5 μm bis zu 12,5 μm (SCHMALBRUCH, 1986). Da in dieser Studie die regenerierten Fasern im Vergleich zu Literaturdaten des gesunden N. ischiadicus mit durchschnittlich 2,5 μm bis 3,0 μm sehr dünn waren, handelte es sich wahrscheinlich vorzugsweise um sensible Nervenfasern, welche für Schmerz-, Druck- und Temperaturempfinden zuständig sind (DUUS, 1995).

Erreicht ein aussprossendes motorisches Axon den Muskel, wird (werden) zunächst nur eine, dann eine zweite, dritte und schließlich immer mehr

Muskelfasern reinnerviert. Das resultierende MAP setzt sich also zu Beginn der Reinnervation aus vielen Einzelpiks zusammen. Mit zunehmendem Auswachsen der Axone erfolgt die Erregung der zu einer motorischen Einheit gehörenden Muskelfasern immer synchroner, so dass zuletzt wieder überwiegend 3-4-phasische MAPs registriert werden können (STÖHR & KRAUS, 2002). Die abgeleiteten MAPs in dieser Studie waren 3-5-phasisch, was auf eine weit vorangeschrittene Reinnervation der Muskulatur hindeutet.

Grund für die verminderte Differenz zwischen maximaler und minimaler Amplitude ist die geringe Myelinisierung. Da anhand der Ergebnisse bezüglich der Remyelinisierung der Axone gezeigt wurde, dass die Fasern noch nicht den Grad der Myelinisierung von gesunden Nervenfasern erreicht hatten, wird in dieser noch unzureichenden Myelinisierung die Ursache für die verminderte Amplitude begründet sein.

Die komplett fehlende Reinnervation der Zielmuskulatur in der HMW-Gruppe ist auf das Fehlen regenerierter motorischer Fasern zurückzuführen. Wie die morphometrische Analyse der Gewebekabel 6 Monate nach Transplantation zeigte, waren in dieser Gruppe bei +15,0 mm keine myelinisierten Axone zu finden. Auch mittels retrograder Markierung konnten keine Motoneurone im Rückenmark nachgewiesen werden.

Im Hinblick auf die fehlende motorische Regeneration in der HMW-Gruppe kann spekuliert werden, dass HMW-FGF-2 möglicherweise einen inhibierenden Effekt auf die motorische Regeneration hat, indem es positiv auf die Regeneration sensorischer Neurone wirkt, welche in die motorischen Zielregionen einwachsen und dort unter Umständen das Einwachsen motorischer Fasern behindern. Des Weiteren wäre es aber auch möglich, dass zur motorischen Regeneration weitere neurotrophe Faktoren benötigt werden.

5. Retrograde Markierung an der Regeneration beteiligter Neurone mit Dil

Beim N. ischiadicus handelt es sich um einen gemischten sensorisch-motorischen Nerven. Aus der Literatur ist bekannt, dass motorische und

sensorische Nervenfasern nach einer Nervenläsion unterschiedlich auswachsen, so regenerieren sensorische Fasern schneller als motorische Fasern (KAWASAKI *et al.*, 2000). Eine weit verbreitete Technik zur Differenzierung zwischen regenerierten sensorischen und motorischen Nervenfasern ist die retrograde Markierung der entsprechenden Zellkörper (BYERS *et al.*, 2002; GUNTINAS-LICHIUS *et al.*, 2001; PUIGDELLIVOL-SANCHEZ *et al.*, 2000). Die retrograde Markierung bezeichnet den Transport von Substanzen von den axonalen und dendritischen Endigungen in Richtung des Perikaryons der Nervenzellen.

Es sollte mittels des retrograd transportierten Fluoreszenzfarbstoffs DiI untersucht werden, ob die verschiedenen FGF-2-Isoformen unterschiedliche Effekte auf die Anzahl der regenerierten sensorischen und motorischen Nervenfasern zeigen. Die im Rückenmark lokalisierten Perikarien der Motoneurone und die in den DRGs liegenden Perikarien der sensorischen Neurone wurden quantifiziert.

Sechs Monate nach Implantation wurden markierte Motoneurone nur in der SZneo- und 18-kDa-Gruppe nachgewiesen, wobei die Anzahl markierter Motoneurone in der 18-kDa-Gruppe etwas höher war als in der SZneo-Gruppe. In der KV- und HMW-Gruppe konnten keine fluoreszierenden Motoneurone gezeigt werden, was das Fehlen von motorischen Fasern im Implantat zur Zeit der Explantation zeigt. Diese Ergebnisse decken sich auch mit den Ergebnissen der elektrophysiologischen Untersuchungen. Die fehlenden regenerierten motorischen Fasern in der KV- und HMW-Gruppe erklären die fehlende Reinnervation der Muskulatur in diesen beiden Tiergruppen.

Die Anzahl der markierten sensorischen neuronalen Zellkörper in den DRGs war in allen Fällen deutlich höher als die der motorischen Neurone im Rückenmark. Es fanden sich in allen Tiergruppen markierte sensorische Neurone, wobei die Anzahl in der HMW-Gruppe tendenziell höher war als in den anderen Gruppen.

Die höhere Anzahl an markierten sensorischen Neuronen im Vergleich zur Anzahl markierter Motoneurone bestätigt die schon in der Literatur beschriebene bessere Regeneration sensorischer Nervenfasern. Diese Aussage wird weiterhin durch den geringen mittleren Durchmesser der regenerierten myelinisierten Axone bekräftigt.

Die erhöhte Anzahl an markierten sensorischen Neuronen in der HMW-Gruppe, zusammen mit der beschleunigten Rückkehr der Sensibilität (Withdrawal-Test, Punkt 3.2) in dieser Gruppe und der aus der Literatur bekannten vermehrten Expression von HMW-FGF-2 in den DRGs nach einer Nervenläsion (MEISINGER & GROTHE, 1997) führen zu dem Schluss, dass HMW-FGF-2 im Vergleich zu 18-kDa-FGF-2 die Regeneration sensorischer Fasern stärker fördert.

6. Quantitative Regeneration

6.1 Distanz regenerierter myelinisierter Axone

In einer dieser Arbeit vorangegangenen Studie über 4 Wochen wurde gezeigt, dass in diesem Zeitraum teilweise Gewebekabel die gesamte Distanz zwischen den Nervenstümpfen überbrückten und dass die regenerierten myelinisierten Axone in diesen Kabeln bis zu 4,75 mm ausgewachsen waren (TIMMER *et al.*, 2003). Daher wurde für die hier diskutierte Studie postuliert, dass für eine erfolgreiche Regeneration nach 3 Monaten die regenerierten Axone mindestens die Mitte (7,5 mm) und nach 6 Monaten mindestens das Ende (15 mm) der zu überbrückenden Lücke erreicht haben sollten.

Es wurde nach 3 Monaten der prozentuale Anteil an regenerierten Gewebekabeln bestimmt, die myelinisierte Axone enthielten, die über die Mitte (+7,5 mm) des Implantates regeneriert waren. Es zeigte sich die beste Regeneration myelinisierter Axone in der HMW-Gruppe, in der als einziger Gruppe die Axone in 100 % der Regenerate über die Mitte des Implantates gewachsen waren. Die KV-Gruppe zeigte überraschender Weise auch in 83 % regenerierte Axone distal der Mitte des Implantates. Aufgrund eines möglichen Sproutings der regenerierten Fasern in dieser Gruppe sind die Daten aber kritisch zu betrachten (siehe Punkt 6.2). In der 18-kDa-Gruppe waren nur in 60 % der Regenerate die Axone über die Mitte des Implantates ausgewachsen.

Es scheint also einen positiven Effekt von HMW-FGF-2 auf das Auswachsen myelinisierter Nervenfasern und auf die Geschwindigkeit der Nervenregeneration zu geben.

Ein Vergleich der 18-kDa-Gruppe mit der SZneo-Gruppe zeigte keine Unterschiede bzgl. der Distanz, die die regenerierten myelinisierten Axone überbrückten. AEBISCHER *et al.* (1989) beschrieben einen positiven Effekt von 18-kDa-FGF-2, das in ein EVA-Implantat inkorporiert war, auf die Regeneration myelinisierter Nervenfasern über weite Distanzen. Der Effekt von transplantierten 18-kDa-FGF-2-überexprimierenden Schwann-Zellen scheint in dem hier verwendeten Versuchsdesign vergleichbar mit dem positiven Effekt von physiologischen Schwann-Zellen zu sein.

Ohne Zugabe von Schwann-Zellen (Matrigel-Gruppe) kam es in keinem Fall zu einer Axonregeneration, die über die Mitte der Implantate hinausging. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die alleinige Zugabe von Schwann-Zellen bereits eine entscheidende Rolle für eine erfolgreiche Regeneration über lange Distanzen spielt (ANSSELIN *et al.*, 1997; EVANS *et al.*, 2002; RODRIGUEZ *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2001).

Die 6-Monats-Gruppe, bei der der prozentuale Anteil an regenerierten Gewebekabeln mit myelinisierten Fasern am distalen Ende des Implantates (+15,0 mm) bestimmt wurde, zeigte im Vergleich zur 3-Monats-Gruppe ein völlig anderes Bild. Die HMW-Gruppe, die nach 3 Monaten die besten Ergebnisse aufwies, zeigte nach 6 Monaten nur 2 regenerierte Gewebekabel, wobei in keinem der Kabel bei +15,0 mm myelinisierte Axone vorhanden waren. Auch die KV-Gruppe wies nur 2 Gewebekabel auf, wobei beide keine durchgewachsenen myelinisierten Fasern enthielten. Die Gruppe mit den am weitesten regenerierten Fasern war nach 6 Monaten die SZneo-Gruppe. In dieser Gruppe waren in 66 % der Regenerate myelinisierte Axone bei +15,0 mm vorhanden. Die 18-kDa-Gruppe zeigte zumindest in 40 % der Fälle bei +15,0 mm myelinisierte Axone.

Elektronenmikroskopische Befunde deuten nach 6 Monaten auf mögliche Degenerationsprozesse hin. Sowohl in der HMW-Gruppe als auch in der 18-kDa-Gruppe konnten unter dem Elektronenmikroskop am distalen Ende der Gewebekabel degenerierte Fasern nachgewiesen werden. In der HMW-Gruppe

waren die für Degenerationserscheinungen typischen zwiebelschalenartigen Ringe der sich entspiralisierenden Myelinschichten nur noch vereinzelt zu erkennen, was auf eine möglicherweise schon weit fortgeschrittene Degeneration von Markfasern hindeutete. Die 18-kDa-Gruppe wies hingegen noch sehr viele dieser degenerierten Fasern auf. Wahrscheinlich befand sich der Degenerationsprozess in dieser Gruppe noch im Anfangsstadium. Diese mögliche Degeneration zuvor regenerierter Fasern könnte auch erklären, warum es zwar innerhalb der ersten 12 Wochen zu einer Rückkehr der Sensorik kam, aber nach 6 Monaten noch immer keine Anzeichen für motorische Regeneration gezeigt werden konnten. Der stark vorangeschrittene Degenerationsprozess in der HMW-Gruppe erklärt weiterhin, warum in dieser Gruppe keine MAPs abgeleitet werden konnten. Da der Prozess in der 18-kDa-Gruppe noch nicht so weit fortgeschritten war, war es in dieser Gruppe noch möglich, evozierte MAPs abzuleiten. Nach Beurteilung der Daten der 3-Monats-Gruppe, scheint die Degeneration zwischen dem 3. und 6. Monat einzusetzen. In der SZneo- und der KV-Gruppe konnten keine degenerativen Erscheinungen festgestellt werden. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass FGF-2 zunächst die axonale Regeneration fördert und dass es im Regenerationsverlauf, eventuell aufgrund fehlender weiterer regenerationsfördernder Substanzen, zur Degeneration kommt.

6.2 Anzahl regenerierter myelinisierter Axone

Die Anzahl der regenerierten myelinisierten Axone wurde anhand von Aufnahmen von semidünnen Querschnitten halbautomatisch mit einem in dieser Arbeitsgruppe entwickelten Computermakro auf der Basis von AnalySIS-Pro® bestimmt (TIMMER *et al.*, 2003). Erst wurden durch das Computerprogramm die Axone automatisch gezählt und anschließend das erhaltene Ergebnis gegebenenfalls manuell korrigiert. So wurden z.B. vom Programm fälschlicherweise mitgezählte Gefäße wieder gelöscht.

In der 3-Monats-Gruppe wurde die Anzahl der Axone an 4 definierten Schnittpunkten (+1,0 mm; +5,0 mm; +7,0 mm; >7,0 mm) und in der 6-Monats-Gruppe an einem Schnittpunkt (+7,0 mm) bestimmt. Aufgrund einer sehr hohen, aber gleichmäßig verteilten Anzahl von Axonen am Schnittpunkt +1,0 mm wurde hier nicht der gesamte Querschnitt, sondern eine Fläche von $10.000 \mu\text{m}^2$ ausgezählt und die Axonanzahl für den gesamten Querschnitt interpoliert. An den weiteren Schnittpunkten wurde der gesamte Querschnitt ausgewertet, da es sonst aufgrund einer unregelmäßigen Verteilung der Axone zu falschen Ergebnisdaten gekommen wäre.

Dies ist ein häufiges Problem bei der Bewertung und dem Vergleich von Daten aus der Literatur. Einige Arbeitsgruppen zählen nicht den gesamten Nervenquerschnitt aus, sondern werten meist nur die Axonanzahl in einer bestimmten Fläche aus, was zu fehlerhaften Ergebnissen führen kann (COUTURIER *et al.*, 2002; FANSA *et al.*, 2003; FRANCELE *et al.*, 2003; GEUNA *et al.*, 2004). Um die in dieser Arbeit bestimmte Anzahl der myelinisierten Axone dennoch mit den Literaturdaten vergleichen zu können, wurde zusätzlich zur absoluten Axonanzahl die Nervendichte pro mm^2 bestimmt.

Die Ergebnisse der 3-Monats-Gruppe zeigten in allen Tiergruppen zu Beginn der Regeneration (+1,0 mm) ein deutliches Auswachsen der Axone des proximalen Stumpfes. Die Axonanzahl war im Vergleich zum gesunden N. ischiadicus, der ca. 7000 – 8000 myelinisierte Axone enthält (JENQ *et al.*, 1986; SCHMALBRUCH, 1986), stark erhöht, was für einen Sprouting-Effekt zu Beginn der Regeneration spricht und nach Nervenläsionen typisch ist (CHOI *et al.*, 1995). Von diesen regenerierten Axonen ist allerdings nur ein sehr geringer Teil weiter ausgewachsen oder wurde über weite Distanzen myelinisiert. Die HMW-Gruppe wies prozentual den größten Anteil an weit regenerierten myelinisierten Axonen auf, so fanden sich in dieser Gruppe bei +5,0 mm, +7,0 mm und >7,0 mm die meisten myelinisierten Axone. Im Verlauf der Regeneration nahm in allen Gruppen die Anzahl myelinisierter Axone nach distal ab, außer in der KV-Gruppe. Diese Gruppe zeigte bei >7,0 mm mehr myelinisierte Axone als bei +7,0 mm, was wieder auf einen Sprouting-Effekt auf bereits weiter ausgewachsene Axone in dieser Tiergruppe hindeutet. Durch ein verstärktes Aufzweigen der

Axone kommt es häufig zu Fehlinnervationen der Muskulatur, deshalb ist dieses im Regenerationsverlauf spät einsetzende Sprouting unerwünscht (GUNTINAS-LICHIOUS *et al.*, 2001; GUNTINAS-LICHIOUS *et al.*, 2005).

Die Nervendichte (myelinisierte Axone / Fläche) wurde von der Querschnittsfläche der Regenerate beeinflusst. Die Querschnittsfläche nimmt in der Mitte der Gewebekabel ab, das Verhältnis von der Anzahl der Axone zur Querschnittsfläche (Nervendichte) bleibt dabei relativ gleich. Am Ende der Regenerate (> 7,0 mm) kam es aufgrund der im Vergleich zur Mitte der Gewebekabel wieder ansteigenden Querschnittsfläche und der weiter abnehmenden Anzahl myelinisierter Axone in allen Tiergruppen, außer der KV-Gruppe, zu einer geringeren Nervendichte. Die Tiere der KV-Gruppe zeigten bei >7,0 mm zwar wie die anderen experimentellen Gruppen eine Zunahme der Querschnittsfläche, allerdings verringerte sich aufgrund der steigenden absoluten Anzahl myelinisierter Axone die Nervendichte in dieser Gruppe nicht so stark wie in den anderen experimentellen Gruppen. Dies ist erneut Ausdruck des postulierten späten Sprouting-Effektes.

Nach 6 Monaten wiesen die SZneo- und 18-kDa-Gruppe die meisten myelinisierten Axone bei +7,0 mm auf. In der KV- und HMW-Gruppe konnten nur sehr wenig myelinisierte Axone gefunden werden. Diese Daten entsprechen damit den Ergebnissen bzgl. der Distanz, über die die regenerierten myelinisierten Axone ausgewachsen waren, den elektrophysiologischen Untersuchungen und der retrograden Markierung.

In der HMW-Gruppe waren wahrscheinlich aufgrund der genannten Degenerationserscheinungen kaum noch myelinisierte Fasern vorzufinden. Da im distalen Bereich der regenerierten Gewebekabel der KV-Gruppe keine degenerierten Fasern zu finden waren, gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen könnte es sein, dass es auch in dieser Gruppe zur Degeneration vorher regenerierter Axone gekommen war, dass diese Degeneration allerdings schon sehr weit fortgeschritten oder abgeschlossen war. Die zweite Möglichkeit wäre, dass aufgrund des erwähnten Sprouting-Effekts in der KV-Gruppe die Axone keinen Anschluss an die Büngner-Bänder fanden, Neurome gebildet haben und nicht weiter ausgewachsen sind.

Aus der Literatur ist eine Degeneration nach vorheriger Regeneration nicht bekannt. Ein ähnlicher Prozess wurde bisher für Maus-Mutanten beschrieben, denen das Gen zur Synthetisierung des Myelinproteins P0 fehlt. Dieses Protein spielt außer bei der Myelinkompaktierung auch eine wesentliche Rolle bei der Myelinerhaltung. Diese Knock-out-Maus entwickelt in den ersten 4 Monaten ihres Lebens ganz normales Myelin, das dann ab dem 4. Lebensmonat zu degenerieren beginnt (NEUBERG *et al.*, 1998). Ein ähnlicher Verlauf der Degeneration myelinisierter Axone wurde für Doppel-knock-out-Mäuse beschrieben, denen das NCAM- und das Myelin-assoziiertes-Glykoprotein-(MAG)-Gen fehlte. Sie entwickelten wie die P0-knock-out-Mäuse in den ersten 4 Lebensmonaten normal myelinisierte Axone, die dann mit zunehmendem Alter degenerierten (GARBY *et al.*, 2000).

Vergleicht man die Anzahl regenerierter myelinisierter Axone der 3-Monats-Gruppe mit Daten anderer Arbeitsgruppen, die auch am N. ischiadicus der Ratte Nervenlücken über große Distanzen (12 mm – 15 mm) mit künstlichen Implantaten, die unterschiedlich befüllt waren, zu überbrücken versuchten (JENQ *et al.*, 1986), sind die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit etwas schlechter. So erzielten AEBISCHER *et al.* (1989) nach Implantation von EVA Implantaten, die FGF-2 freisetzen, schon nach 1 Monat eine etwas höhere Anzahl myelinisierter Axone als in dieser Studie nach 3 Monaten. Auch BINI *et al.* (2004), die mit 12 mm eine etwas kürzere Distanz überbrückten, konnten 1 Monat nach Implantation von leeren PLGA-Implantaten ähnliche Ergebnisse bzgl. der Anzahl regenerierter myelinisierter Axone vorweisen wie in dieser Studie nach 3 Monaten. FINE *et al.* (2002) zeigten 7 Monate nach Einsetzen von BDNF oder NGF freisetzenden EVA-Implantaten einen sehr positiven Einfluss von BDNF auf die Axonregeneration, wohingegen die Anzahl regenerierter myelinisierter Axone unter NGF-Einfluss sehr viel geringer war und in etwa den Ergebnissen der HMW-Gruppe dieser Arbeit entsprach. ANSELIN *et al.* (1997) hingegen konnten 3 Monate nach Einsetzen von Kollagen-Interponaten, die mit unterschiedlichen Konzentrationen von Schwann-Zellen befüllt waren, im distalen Bereich regenerierter Gewebekabel nur sehr wenig regenerierte Axone nachweisen (keine genauen Angaben). Allerdings stieg in der Studie das

Auswachsen der Axone ab dem 3. Monat sprunghaft an; nach 6 Monaten lag die Anzahl der regenerierten Fasern mit ca. 12.500 weit über der Anzahl, die in der hier vorliegenden Arbeit in der SZneo-Gruppe erreicht wurde.

Des Weiteren weist die Arbeit von ANSSELIN *et al.* (1997) auf eine Abhängigkeit der Regeneration von der implantierten Zellzahl hin. Bei einer höheren Schwann-Zell-Konzentration war die Axonanzahl nach 6 Monaten deutlich erhöht (ANSSELIN *et al.*, 1997). Da in dieser Arbeit nur die Dichte, nicht aber die absolute Anzahl der implantierten Zellen aus versuchstechnischen Gründen konstant gehalten werden konnte, wurden die Ergebnisse auf einen solchen Effekt hin betrachtet. Es konnte aber kein Zusammenhang zwischen dem Regenerationsverhalten und der implantierten Zellzahl gefunden werden.

Die Implantation von HMW-FGF-2-überexprimierenden Schwann-Zellen scheint nach autologen Nerventransplantaten trotz allem eine viel versprechende Möglichkeit zur initialen Regenerationsförderung zu sein. Die regenerierten myelinisierten Axone dieser Gruppe wuchsen nach einem sehr ausgeprägten Einwachsen in das Implantat relativ kontinuierlich und weit aus.

6.3 Durchmesser regenerierter myelinisierter Axone

Die Durchmesser der regenerierten myelinisierten Axone wurden in der 3-Monats- und der 6-Monats-Gruppe automatisch von dem oben genannten Computermakro ausgemessen.

Der Durchmesser unterschied sich in der 3-Monats-Gruppe nur an Schnittpunkt +5,0 mm zwischen der KV- und HMW-Gruppe. An allen anderen Schnittpunkten wiesen die Tiergruppen ähnliche Werte auf. Vergleich man allerdings die Durchmesser der Axone innerhalb einer Tiergruppe, konnte in allen Tiergruppen ein verringerter Axondurchmesser in der Mitte der Regenerate festgestellt werden. Dieser geringe Axondurchmesser korreliert mit der geringen Querschnittsfläche in der Mitte der Regenerate. Entweder ist der Durchmesser der regenerierten Axone in der Mitte der Kabel geringer, da die Querschnittsfläche in der Mitte der Regenerate abnahm, und den

auswachsenden Axonen einfach weniger Fläche zur Verfügung stand oder die geringere Querschnittsfläche resultiert aus dem geringen Axondurchmesser.

Nach 6 Monaten Beobachtungszeitraum war der mittlere Axondurchmesser bei allen Tiergruppen im Vergleich zum mittleren Durchmesser der Tiere der 3-Monats-Gruppe etwas geringer. Auch hier gab es an Schnittpunkt +7,0 mm keine Unterschiede zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen.

Verglich man die Daten dieser Studie mit den Werten eines gesunden N. ischiadicus (SCHMALBRUCH, 1986), fällt auf, dass der Axondurchmesser in der vorliegenden Studie vergleichsweise gering war. Ein verringerter Axondurchmesser nach Nervenläsion wird auch in der Literatur häufig beschrieben (BARRAS *et al.*, 2002; CHOI *et al.*, 1995; DIETZMANN, 1990; GOMEZ *et al.*, 1996; MEEK *et al.*, 2001; VLEGGEERT-LANKAMP *et al.*, 2004). Bei den Ergebnissen dieser Arbeit liegt allerdings auch die Vermutung nahe, dass es sich bei den regenerierten Axonen vorzugsweise um sensible Fasern handelt, welche im Vergleich zu motorischen Fasern einen geringeren Durchmesser haben.

CHEN *et al.* (1999) zeigten, dass nach Unterbinden der endogenen FGF-2-Produktion durch einen FGF-2-neutralisierenden Antikörper der Durchmesser der regenerierten Axone sehr gering ist. Daraus schlossen sie, dass FGF-2 ein wichtiger Faktor für das Auswachsen von Axonen mit einem großen Durchmesser ist. Dies widerspricht allerdings unseren Ergebnissen. Es konnte in dieser Arbeit kein Einfluss von FGF-2 auf den Axondurchmesser festgestellt werden.

6.4 G-ratio

Beim g-ratio handelt es sich um einen Index, der den Grad der Myelinisierung eines Axons angibt. Er errechnet sich aus dem Verhältnis von Axondurchmesser zu dem gesamten Faserdurchmesser. Je kleiner der g-ratio ist, umso besser ist das Axon myelinisiert. Der Axondurchmesser und die Dicke des Myelins weisen eine enge positive Korrelation auf, je größer der Axondurchmesser desto dicker die Myelinschicht (FRAHER & DOCKERY, 1998).

Der g-ratio wurde in der 3-Monats-Gruppe an den 4 definierten Schnittpunkten (+1,0 mm, +5,0 mm, +7,0 mm, >7,0 mm) und in der 6-Monats-Gruppe an Schnittpunkt +7,0 mm für jeweils 100 beliebige Axone pro Querschnitt berechnet. Axondurchmesser und der gesamte Faserdurchmesser wurden mit AnalySIS-Pro® vermessen.

Im gesunden Nerv liegt der g-ratio zwischen 0,6 – 0,7 (FANSA *et al.*, 1999). Dieser Wert wurde in keiner Tiergruppe weder nach 3 noch nach 6 Monaten erreicht, was für eine noch unzureichende Myelinisierung der Axone spricht. Das ist ein im Verlauf der Nervenregeneration häufig beschriebener Sachverhalt (CHOI *et al.*, 1995; FANSA *et al.*, 1999; FRANCELE *et al.*, 2003; MEEK *et al.*, 2001). Die geringere Myelinisierung zusammen mit dem schon erwähnten geringen Axondurchmesser ist vermutlich auch Ursache für die geringen Nervenleitgeschwindigkeiten in der SZneo- und 18-kDa-Gruppe nach 6 Monaten.

In der 3-Monats-Gruppe zeigten die zuerst regenerierten Fasern (Schnittpunkt +1,0 mm) in der Matrigel- und SZneo-Gruppe im Vergleich zu den anderen Tiergruppen die beste Myelinisierung. In der SZneo-Gruppe blieb sie nach distal relativ konstant. Die Axone in der 18-kDa-, KV- und HMW-Gruppe wiesen zu Beginn der Gewebekabel sehr hohe g-ratios auf, was für eine geringe Myelinisierung spricht. Dieser hohe g-ratio der KV-Gruppe blieb im Lauf der Regeneration konstant. Der g-ratio der 18-kDa-Gruppe schwankte im Bereich von 0,73 bis 0,75. Besonders am Ende der Regenerate wies diese Gruppe im Vergleich zur SZneo- und HMW-Gruppe sehr hohe Werte und somit eine schlechte Myelinisierung auf.

Es scheint also einen inhibierenden Effekt von *in vivo*-überexprimiertem 18-kDa-FGF-2 auf die Myelinisierung zu geben. Dieses Ergebnis deckt sich auch mit aus der Literatur bekannten Daten. So wurde von MORGAN *et al.* (1994) eine inhibierende Wirkung von 18-kDa-FGF-2 auf die Forskolin-vermittelte Expression vom Myelinprotein P0 *in vitro* und somit auf die Myelinisierung beschrieben. Des Weiteren wurde in FGF-2-deletierten Mäusen nach einer Nervenläsion eine bessere Myelinisierung nachgewiesen als in den Kontrolltieren (JUNGnickel *et al.*, 2004). Auch im ZNS wurde die inhibierende Wirkung von

FGF-2 auf die Myelinsynthese von Oligodendrozyten beschrieben (BUTT & DINSDALE, 2005a; BUTT & DINSDALE, 2005b; GODDARD *et al.*, 2001).

Im Gegensatz zum 18-kDa-FGF-2 zeigte HMW-FGF-2 einen völlig anderen Regenerationsverlauf bzgl. der Myelinisierung der regenerierten Fasern. Zu Beginn der Gewebekabel war der g-ratio der Axone der HMW-Gruppe sehr hoch und sank im Verlauf der Regeneration kontinuierlich ab. Am Ende der Regenerate wies diese Gruppe den niedrigsten g-ratio und somit die beste Myelinisierung auf. Die HMW-FGF-2-Isoform scheint also zu Beginn der Regeneration die Myelinisierung zu unterdrücken und später scheint dieser Effekt aufgehoben und es kam sogar zu einer Förderung der Myelinisierung. Verglichen mit den Daten bzgl. der Distanz der regenerierten Fasern kann man sagen, dass HMW-FGF-2 nach einer Nervenläsion die Remyelinisierung besonders über lange Distanzen fördert. Des Weiteren scheint es im Bezug auf die Remyelinisierung einen Unterschied zwischen der 18-FGF-2-Isoform und den HMW-FGF-2-Isoformen zu geben.

Sechs Monate nach Implantation war kein Unterschied im g-ratio regenerierter Axone zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen zu sehen. Im Vergleich der 3- und 6-Monats-Daten allerdings zeigte sich innerhalb der SZneo- und KV-Gruppe eine leichte Verbesserung des g-ratio. In der HMW-Gruppe blieb der Wert konstant und die 18-kDa-Gruppe zeigte sogar eine leichte Verschlechterung, was wieder für den negativen Einfluss von 18-kDa-FGF-2 auf die Myelinisierung spricht.

6.5 Blutgefäße

Da aus der Literatur ein positiver Einfluss von 18-kDa-FGF-2 auf die Angiogenese bekannt ist (CHEN *et al.*, 1999; GRANT *et al.*, 1993; GROTHE & NIKKHAH, 2001; ORNITZ & ITOH, 2001; SCHMIDT & LEACH, 2003), sollten die Regenerate auch bzgl. ihrer Revaskularisierung untersucht werden.

In der 3-Monats-Gruppe wurde bei Schnittpunkt +5,0 mm der prozentuale Anteil an vaskularisierter Fläche von der Gesamtfläche berechnet. Die 18-kDa-Gruppe

zeigte tendenziell den prozentual größten Anteil an vaskularisierter Fläche. In dieser Gruppe waren signifikant mehr Gefäße zu finden als in der HMW-Gruppe. Die HMW-Gruppe zeigte im Vergleich zu allen anderen Tiergruppen die schlechteste Revaskularisierung. Diese Daten zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden FGF-2-Isoformen bzgl. ihres Einflusses auf das Auswachsen von Gefäßen. 18-kDa-FGF-2 scheint die Vaskularisierung zu fördern, wohingegen HMW-FGF-2 sie sogar zu vermindern scheint. Dieses Ergebnis der 3-Monats-Gruppe steht allerdings im Widerspruch zu Daten von HOBSON *et al.* (2000), die in ihrer Arbeit einen engen Zusammenhang zwischen Vaskularisierung und Nervenregeneration zeigten. Je besser die Vaskularisierung, umso besser die Regeneration. In der vorliegenden Studie zeigte die schlechter revaskularisierte HMW-Gruppe allerdings tendenziell nach 3 Monaten eine stärkere regenerationsfördernde Wirkung als die 18-kDa-Gruppe. Nach 6 Monaten dagegen wiesen die Tiere der HMW-Gruppe neben der KV-Gruppe die schlechteste Regeneration myelinisierter Axone und Degenerationserscheinungen auf. Möglicherweise liegt dieser Lang-Zeit-Effekt in der unzureichenden Revaskularisierung und somit schlechteren Versorgung des regenerierten Gewebes nach Transplantation von HMW-FGF-2-überexprimierenden Schwann-Zellen begründet.

7. Zusammenfassende Diskussion

Es gibt viele Studien, die sich mit den Effekten verschiedener Wachstumsfaktoren auf die Regeneration über weite Distanzen im PNS, wie z.B. 18-kDa-FGF-2 (AEBISCHER *et al.*, 1989), GDNF, NGF (BARRAS *et al.*, 2002; FINE *et al.*, 2002; XU *et al.*, 2003) oder NT-3 und NT-4 (SIMON *et al.*, 2003; XU *et al.*, 1995), beschäftigen. Allerdings wurden diese Faktoren nicht mittels genetisch modifizierter Schwann-Zellen appliziert. In einer Kurzzeitstudie dieser Arbeitsgruppe konnten die regenerationsfördernden Eigenschaften von HMW-FGF-2-überexprimierenden Schwann-Zellen gezeigt werden (TIMMER *et al.*, 2003). Des Weiteren ist bekannt, dass die unterschiedlichen Isoformen von FGF-2, die

18-kDa Isoform und die HMW-FGF-2-Isoformen, nach einer Nervenläsion unterschiedlich stark und zeitlich versetzt exprimiert werden. So wurde nach einer Nervenverletzung in den DRGs eine vermehrte Expression der HMW-FGF-2-Isoformen im Vergleich zur 18-kDa-FGF-2-Isoform beobachtet, was auf einen speziellen Einfluss von HMW-FGF-2 auf sensorische Neurone hinweist (MEISINGER & GROTHE, 1997). Die 18-kDa-FGF-2-Isoform wird bereits 5 h nach einer Nervenläsion vermehrt exprimiert, während die verstärkte Expression von HMW-FGF-2 nach 7 Tagen beginnt (GROTHE *et al.*, 2000; MEISINGER & GROTHE, 1997).

Anhand der Ergebnisse, die in dieser Arbeit erhoben wurden, kann man von einem positiven Effekt der HMW-FGF-2-Isoformen auf die Regeneration sensorischer Nervenfasern ausgehen. So zeigten die Tiere der HMW-Gruppe im Withdrawal-Test bereits nach 4 Wochen erste Anzeichen von sensorischer Nervenregeneration, wohingegen die Rückkehr der Sensibilität in der 18-kDa-Gruppe erst nach 12 Wochen beobachtet wurde. Ein weiterer Nachweis für den positiven Einfluss von HMW-FGF-2 auf die Regeneration sensorischer Fasern ist die im Vergleich zu den anderen Tiergruppen erhöhte Anzahl retrograd markierter sensorischer Neurone in den DRGs dieser Tiergruppe.

Weiterhin kann aufgrund der fehlenden regenerierten Motoneurone und Degenerationserscheinungen in der HMW-Gruppe nach 6 Monaten von einem möglichen inhibierenden Effekt von HMW-FGF-2 auf die Regeneration motorischer Neurone ausgegangen werden. Da die 18-kDa-Gruppe ebenfalls Degenerationserscheinungen aufwies, diese aber noch nicht soweit fortgeschritten waren wie in der HMW-Gruppe, ist hier ein zeitlich unterschiedlich gestalteter Effekt der *in vivo*-Überexpression der FGF-2-Isoformen zu erkennen.

Auch bzgl. der Myelinisierung gibt es Unterschiede zwischen den FGF-2-Isoformen. So konnte für die 18-kDa-FGF-2-Isoform im Regenerationsverlauf über 3 Monate durchgehend eine schlechte Myelinisierung festgestellt werden. Besonders im distalen Bereich der Regenerate zeigte die 18-kDa-Gruppe im Vergleich zur SZneo- und HMW-Gruppe eine verminderte Remyelinisierung der regenerierten Fasern. Diese Ergebnisse weisen auf eine inhibierende Wirkung der

18-kDa-FGF-2-Isoform auf die Myelinisierung *in vivo* hin. Dieser Effekt von 18-kDa-FGF-2 wurde *in vitro* von MORGAN *et al.* (1994) beschrieben. Des Weiteren ist eine bessere Remyelinisierung nach einer Nervenläsion von 18-kDa-FGF-2-knock-out Mäusen bekannt (JUNGNICKEL *et al.*, 2004), was für den inhibierenden Effekt der 18-kDa-FGF-2-Isoform *in vivo* spricht. Auch zeigte sich *in vitro* nach Zugabe von FGF-2 zu Schwann-Zell-Kulturen ein mitogener Effekt von FGF-2 auf die Schwann-Zellen (DAVIS & STROOBANT, 1990). Diese Daten werden auch von bisher unveröffentlichten Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Frau Professor Grothe unterstützt (Persönliche Mitteilung von Frau Professor Grothe und Dr. Jungnickel). So wurde *in vivo* bei FGF-2-überexprimierenden-Mäusen gezeigt, dass nach einer Nervenläsion die Proliferation der Schwann-Zellen um 25 % höher war als bei Wild-Typ-Mäusen. Möglicherweise stimuliert FGF-2 erst die Schwann-Zell-Proliferation, um das Auswachsen von Axonen zu unterstützen und inhibiert derweil die Remyelinisierung der Axone.

Die HMW-FGF-2-Isoformen dagegen scheinen im Nervenregenerationsmodell über lange Distanzen die Remyelinisierung der regenerierten Axone nur zu Beginn der Regeneration zu unterdrücken, was sich in den hohen Werten des g-ratios im proximalen Bereich der Regenerate widerspiegelt. Im weiteren Regenerationsverlauf sinkt der g-ratio kontinuierlich ab, was eine bessere Myelinisierung bedeutet. Am distalen Ende der Regenerate wies die HMW-Gruppe sogar die beste Myelinisierung auf. Auch war in dieser Gruppe eine besonders weit reichende Myelinisierung regenerierter Fasern zu beobachten. Diese Befunde deuten auf einen positiven Einfluss der HMW-FGF-2-Isoformen auf die Remyelinisierung insbesondere über weite Distanzen hin.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass es bei *in vivo*-Überexpression unterschiedlicher FGF-2-Isoformen unterschiedliche biologische Effekte und temporäre Unterschiede im Verlauf der peripheren Nervenregeneration gibt.

8. Ausblick

Die im Rahmen dieser Studie erarbeiteten Ergebnisse zur Untersuchung der Effekte einer Überexpression von FGF-2-Isoformen *in vivo* auf die funktionelle und axonale Nervenregeneration nach großem Substanzverlust bieten die Grundlage für weitere Versuche. Es konnten in dieser Arbeit unterschiedliche Effekte der 18-kDa-FGF-2- und der HMW-FGF-2-Isoformen, überexprimiert von implantierten genetisch veränderten Schwann-Zellen, auf die periphere Nervenregeneration über weite Distanzen *in vivo* gezeigt werden. Die Transplantation von HMW-FGF-2-überexprimierenden Schwann-Zellen scheint eine viel versprechende Möglichkeit zu sein, um nach einer Nervenverletzung mit großem Gewebeverlust die Regeneration sensorischer Neurone zu fördern.

Wie schon in der Einleitung erwähnt, zeigen auch andere neurotrophe Faktoren einen positiven Effekt auf die periphere Nervenregeneration. So konnten MIDHA *et al.* (2003) nach Implantation synthetischer Interponate, welche in Kollagen suspendiertes FGF-1 enthielten, eine ähnlich hohe Anzahl an regenerierten myelinisierten Axonen nachweisen, wie nach Transplantation von autologem Nervengewebe. In derselben Studie wurden auch Interponate mit BDNF implantiert, was auch zu einem Regenerationserfolg führte, allerdings nicht vergleichbar mit dem Effekt von FGF-1. Einen unterschiedlichen Effekt von BDNF und NGF auf die periphere Nervenregeneration beschrieben FINE *et al.* (2002). In einer vergleichenden Studie zeigte die Arbeitsgruppe nach Implantation von synthetischen Interponaten, die BDNF oder NGF freisetzten, für beide Faktoren eine regenerationsfördernde Wirkung, die allerdings bei BDNF ausgeprägter war. Auch von XU *et al.* (1995) wurden für NGF, der in Polyphosphoresterpolymer eingekapselt war und in einem synthetisches Interponat transplantiert wurde, ein regenerationsfördernder Effekt beschrieben. Aufgrund der genannten vielfältigen Möglichkeiten, die Nervenregeneration durch die Zugabe von neurotrophen Faktoren zu steigern, wäre die Transplantation von mehreren Faktoren in Kombination miteinander ein nächster viel versprechender Versuchsansatz.

Um die ausgewählte neurotrophe Substanz kontinuierlich im Implantat freizusetzen, eignen sich genetisch modifizierte Schwann-Zellen besonders gut. Schwann-Zellen sind auch unter natürlichen Bedingungen im PNS an regenerativen Prozessen beteiligt und tragen zu einem regenerationsfördernden Milieu bei (EVANS, 2001; FU & GORDON, 1997).

Weiterhin müsste der günstigste Zeitpunkt zur Freisetzung verschiedener neurotropher Faktoren bestimmt werden, um deren regenerationsfördernden Eigenschaften optimal nutzen und den Regenerationsverlauf besser steuern zu können. Die applizierten Faktoren können je nach Art und Zeitpunkt der Applikation additive, komplementäre oder sukzessive Effekte zeigen.

NGF, das nach einer Nervenläsion hochreguliert wird, ist zwar für das Überleben von Neuronen wichtig und fördert auch die axonale Regeneration, allerdings konnte gezeigt werden, dass bei ständiger Applikation von NGF der Beginn der Regeneration verzögert wurde (TERENGHI, 1999). Daraus schloss man, dass das initiale Fehlen von NGF direkt nach einer Läsion möglicherweise ein Startsignal für die Regeneration ist (TERENGHI, 1999). Weiterhin fördert NGF nur das Auswachsen sensorischer Neurone nicht aber das motorischer Fasern und führte nach Applikation im ZNS zum Sprouting sensorischer Neurone, was zu chronischen Schmerzen führte (SCHMIDT & LEACH, 2003).

BDNF fördert das Überleben von Motoneuronen und die axonale Regeneration sowohl motorischer als auch sensorischer Fasern, allerdings scheint die Wirkung von BDNF dosisabhängig zu sein und ist daher schwer einzuschätzen (SCHMIDT & LEACH, 2003; TERENGHI, 1999).

Ein weiterer wichtiger neurotropher Faktor ist CNTF (SCHMIDT & LEACH, 2003). CNTF ist physiologisch im Cytoplasma von Schwann-Zellen lokalisiert und zeichnet sich durch seinen positiven Einfluss auf das Überleben von Motoneuronen *in vitro* aus und verhindert den verletzungsinduzierten Untergang von neonatalen Motoneuronen (TERENGHI, 1999). Weiterhin stimuliert CNTF die Myelinisierung von regenerierenden Axonen, ohne dabei die Regeneration proximaler Axone zu beeinflussen (TERENGHI, 1999). An CNTF-knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Nervenfasern dieser Tiere im Vergleich zu

Wildtyp-Tieren nach einer Nervenläsion nicht vollständig regenerierten und CNTF somit ein wichtiger Faktor für die Nervenregeneration ist (YAO *et al.*, 1999).

GNDF ist ein das Überleben von Motoneuronen *in vitro* und *in vivo* fördernder neurotropher Faktor. Es fördert nach Applikation im Regenerationsverlauf die Nervenleitgeschwindigkeit von Motoneuronen und von sensorischen Neuronen mit kleinem Durchmesser (TERENGHI, 1999).

Wie schon beschrieben, wirkt sich FGF-2 auf die Schwann-Zell-Proliferation *in vitro* und *in vivo* aus und unterstützt so möglicherweise die axonale Regeneration (DAVIS & STROOBANT, 1990; persönliche Mitteilung von Frau Prof. Grothe und Frau Dr. Jungnickel). Auch die Faktoren NT-4/5 werden in der frühen Regenerationsphase benötigt. Es zeigte sich nach Transplantation von allogenem Nervengewebe aus NT-4/5-knockout-Mäusen ein vermindertes Auswachsen der regenerierenden Axone (ENGLISH *et al.*, 2005).

So könnten in einer weiter entwickelten Transplantations-Therapie z.B. Faktoren, die das Auswachsen der Axone fördern, zu Beginn der Regeneration freigesetzt werden. Andere Substanzen hingegen, die die Myelinisierung beeinflussen oder ein gezieltes Auswachsen der Axone bewirken, könnten zeitlich versetzt etwas später ausgeschüttet werden.

Mit Ausblick auf eine klinische Anwendung sollte einer der nächsten Schritte die Implantation autologer, adulter, genetisch modifizierter Schwann-Zellen im etablierten Regenerationsmodell des N. ischiadicus adulter Ratten sein. *In vitro*-Studien dieser Arbeitsgruppe konnten schon die erfolgreiche Kultivierung und Transfektion adulter Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen zeigen (MAURITZ *et al.*, 2004a; MAURITZ *et al.*, 2004b). Weiterführend müssten *in vivo* die regenerationsfördernden Eigenschaften weiterer Faktoren, überexprimiert von adulten Schwann-Zellen der Ratte und des Menschen im beschriebenen Tiermodell untersucht werden.

VI. Literaturverzeichnis

- AEBISCHER P, SALESIOTIS AN & WINN SR (1989). Basic fibroblast growth factor released from synthetic guidance channels facilitates peripheral nerve regeneration across long nerve gaps. *J Neurosci Res*, 23, 282-9.
- AL-ADAWI S, DAWE GS, BONNER A, STEPHENSON JD & ZAREI M (2002). Central noradrenergic blockade prevents autotomy in rat: implication for pharmacological prevention of postdenervation pain syndrome. *Brain Res Bull*, 57, 581-6.
- AL-MAJED AA, NEUMANN CM, BRUSHART TM & GORDON T (2000). Brief electrical stimulation promotes the speed and accuracy of motor axonal regeneration. *J Neurosci*, 20, 2602-8.
- ALOISI F (2003). Growth factors. *Neurol Sci*, 24, 291-294.
- ANSSELIN AD, FINK T & DAVEY DF (1997). Peripheral nerve regeneration through nerve guides seeded with adult Schwann cells. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 23, 387-98.
- BAIN JR, MACKINNON SE & HUNTER DA (1989). Functional evaluation of complete sciatic, peroneal, and posterior tibial nerve lesions in the rat. *Plast Reconstr Surg*, 83, 129-38.
- BARRAS FM, PASCHE P, BOUCHE N, AEBISCHER P & ZURN AD (2002). Glial cell line-derived neurotrophic factor released by synthetic guidance channels promotes facial nerve regeneration in the rat. *J Neurosci Res*, 70, 746-55.
- BINI TB, GAO S, XU X, WANG S, RAMAKRISHNA S & LEONG KW (2004). Peripheral nerve regeneration by microbraided poly(L-lactide-co-glycolide) biodegradable polymer fibers. *J Biomed Mater Res*, 68A, 286-95.
- BRUSHART TM (1993). Motor axons preferentially reinnervate motor pathways. *J Neurosci*, 13, 2730-8.
- BRUSHART TM (1988). Preferential reinnervation of motor nerves by regenerating motor axons. *J Neurosci*, 8, 1026-31.

- BRUSHART TM, HOFFMAN PN, ROYALL RM, MURINSON BB, WITZEL C & GORDON T (2002). Electrical stimulation promotes motoneuron regeneration without increasing its speed or conditioning the neuron. *J Neurosci*, 22, 6631-8.
- BRUSHART TM & SEILER WD (1987). Selective reinnervation of distal motor stumps by peripheral motor axons. *Exp Neurol*, 97, 289-300.
- BUNGE RP (1993). Expanding roles for the Schwann cell: ensheathment, myelination, trophism and regeneration. *Curr Opin Neurobiol*, 3, 805-9.
- BUTI M, VERDU E, LABRADOR RO, VILCHES JJ, FORES J & NAVARRO X (1996). Influence of physical parameters of nerve chambers on peripheral nerve regeneration and reinnervation. *Exp Neurol*, 137, 26-33.
- BUTT AM & DINSDALE J (2005a). Fibroblast growth factor 2 induces loss of adult oligodendrocytes and myelin in vivo. *Exp Neurol*, 192, 125-33.
- BUTT AM & DINSDALE J (2005b). Fibroblast growth factor 2 mediated disruption of myelin-forming oligodendrocytes in vivo is associated with increased tau immunoreactivity. *Neurosci Lett*, 375, 28-32.
- BYERS CT, FAN R, MESSINA A, MORRISON WA & GALEA MP (2002). Comparing the efficacy of two fluorescent retrograde tracers in labeling the motor and sensory neuron populations of the rat sciatic nerve. *J Neurosci Methods*, 114, 159-64.
- CARR MM, BEST TJ, MACKINNON SE & EVANS PJ (1992). Strain differences in autotomy in rats undergoing sciatic nerve transection or repair. *Ann Plast Surg*, 28, 538-44.
- CEBALLOS D, NAVARRO X, DUBEY N, WENDELSCHAFER-CRABB G, KENNEDY WR & TRANQUILLO RT (1999). Magnetically aligned collagen gel filling a collagen nerve guide improves peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol*, 158, 290-300.
- CHEN YS, HSIEH CL, TSAI CC, CHEN TH, CHENG WC, HU CL & YAO CH (2000). Peripheral nerve regeneration using silicone rubber chambers filled with collagen, laminin and fibronectin. *Biomaterials*, 21, 1541-7.
- CHEN YS, MURAKAMI S, GYO K, WAKISAKA H, MATSUDA S & SAKANAKA M (1999). Effects of basic fibroblast growth factor (bFGF)-neutralizing antibody and platelet factor 4 on facial nerve regeneration. *Exp Neurol*, 155, 274-83.

- CHOI SJ, HARI K, LEE MJ, FURUYA F & UEDA K (1995). Electrophysiological, morphological, and morphometric effects of aging on nerve regeneration in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 29, 133-40.
- CLAUS P, DORING F, GRINGEL S, MULLER-OSTERMEYER F, FUHLROTT J, KRAFT T & GROTHE C (2003). Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and specific interaction with the survival of motoneuron protein. *J Biol Chem*, 278, 479-85.
- COUTURIER CA, DAUGE MC, HENIN D, ALNOT JY & MASMEJEAN EH (2002). Nerve repair using a composite graft of vein and denatured skeletal muscle: morphologic analysis. *J Reconstr Microsurg*, 18, 681-8.
- CRAWLEY JN (2000). *What is wrong with my mouse?* Wiley-Liss, New York
- DANIELSEN N, PETTMANN B, VAHLSING HL, MANTHORPE M & VARON S (1988). Fibroblast growth factor effects on peripheral nerve regeneration in a silicone chamber model. *J Neurosci Res*, 20, 320-30.
- DAVIS JB & STROOBANT P (1990). Platelet-derived growth factors and fibroblast growth factors are mitogens for rat Schwann cells. *J Cell Biol*, 110, 1353-60.
- DE KONING P, BRAKKEE JH & GISPEN WH (1986). Methods for producing a reproducible crush in the sciatic and tibial nerve of the rat and rapid and precise testing of return of sensory function. Beneficial effects of melanocortins. *J Neurol Sci*, 74, 237-46.
- DE MEDINACELI L, FREED WJ & WYATT RJ (1982). An index of the functional condition of rat sciatic nerve based on measurements made from walking tracks. *Exp Neurol*, 77, 634-43.
- DERBY A, ENGLEMAN VW, FRIEDRICH GE, NEISES G, RAPP SR & ROUFA DG (1993). Nerve growth factor facilitates regeneration across nerve gaps: morphological and behavioral studies in rat sciatic nerve. *Exp Neurol*, 119, 176-91.
- DIETZMANN K (1990). Regeneration processes in peripheral nerves following nerve transection. *Zentralbl Allg Pathol*, 136, 525-36.

- DIJKSTRA JR, MEEK MF, ROBINSON PH & GRAMSBERGEN A (2000). Methods to evaluate functional nerve recovery in adult rats: walking track analysis, video analysis and the withdrawal reflex. *J Neurosci Methods*, 96, 89-96.
- DINSE H & EYSEL T (2003). Leistungssteigerung und Plastizität bis ins hohe Alter. *Physiotherapie*, 6, 19-22.
- DONNERER J (2003). Regeneration of primary sensory neurons. *Pharmacology*, 67, 169-81.
- DONO R (2003). Fibroblast growth factors as regulators of central nervous system development and function. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 284, R867-81.
- DUUS P (1995). *Neurologisch-topische Diagnostik*. 6. Auflage, Georg Thieme-Verlag Stuttgart New York
- ENGLISH AW, MEADOR W & CARRASCO DI (2005). Neurotrophin-4/5 is required for the early growth of regenerating axons in peripheral nerve. *European Journal of Neuroscience*, 21, 2624-2634.
- EVANS GR (2001). Peripheral nerve injury: a review and approach to tissue engineered constructs. *Anat Rec*, 263, 396-404.
- EVANS GR, BRANDT K, KATZ S, CHAUVIN P, OTTO L, BOGLE M, WANG B, MESZLENYI RK, LU L, MIKOS AG & PATRICK CW, JR. (2002). Bioactive poly(L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 23, 841-8.
- EVANS PJ, MACKINNON SE, BEST TJ, WADE JA, AWERBUCK DC, MAKINO AP, HUNTER DA & MIDHA R (1995). Regeneration across preserved peripheral nerve grafts. *Muscle Nerve*, 18, 1128-38.
- FANSA H, DODIC T, WOLF G, SCHNEIDER W & KEILHOFF G (2003). Tissue engineering of peripheral nerves: Epineurial grafts with application of cultured Schwann cells. *Microsurgery*, 23, 72-7.
- FANSA H, KEILHOFF G, FORSTER G, SEIDEL B, WOLF G & SCHNEIDER W (1999). Acellular muscle with Schwann-cell implantation: an alternative biologic nerve conduit. *J Reconstr Microsurg*, 15, 531-7.

- FERIA M, ABAD F, SANCHEZ A & ABREU P (1993). Magnesium sulphate injected subcutaneously suppresses autotomy in peripherally deafferented rats. *Pain*, 53, 287-93.
- FINE EG, DECOSTERD I, PAPALOIZOS M, ZURN AD & AEBISCHER P (2002). GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap. *Eur J Neurosci*, 15, 589-601.
- FLORKIEWICZ RZ, SHIBATA F, BARANKIEWICZ T, BAIRD A, GONZALEZ AM, FLORKIEWICZ E & SHAH N (1991). Basic fibroblast growth factor gene expression. *Ann N Y Acad Sci*, 638, 109-26.
- FLORKIEWICZ RZ & SOMMER A (1989). Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 3978-81.
- FRAHER J & DOCKERY P (1998). A strong myelin thickness-axon size correlation emerges in developing nerves despite independent growth of both parameters. *J Anat*, 193 (Pt 2), 195-201.
- FRANCEL PC, FRANCEL TJ, MACKINNON SE & HERTL C (1997). Enhancing nerve regeneration across a silicone tube conduit by using interposed short-segment nerve grafts. *J Neurosurg*, 87, 887-92.
- FRANCEL PC, SMITH KS, STEVENS FA, KIM SC, GOSSETT J, GOSSETT C, DAVIS ME, LENAERTS M & TOMPKINS P (2003). Regeneration of rat sciatic nerve across a LactoSorb bioresorbable conduit with interposed short-segment nerve grafts. *J Neurosurg*, 99, 549-54.
- FU SY & GORDON T (1997). The cellular and molecular basis of peripheral nerve regeneration. *Mol Neurobiol*, 14, 67-116.
- FU SY & GORDON T (1995). Contributing factors to poor functional recovery after delayed nerve repair: prolonged denervation. *J Neurosci*, 15, 3886-95.
- FUJIMOTO E, MIZOGUCHI A, HANADA K, YAJIMA M & IDE C (1997). Basic fibroblast growth factor promotes extension of regenerating axons of peripheral nerve. In vivo experiments using a Schwann cell basal lamina tube model. *J Neurocytol*, 26, 511-28.

- FUNAKOSHI H, FRISEN J, BARBANY G, TIMMUSK T, ZACHRISSON O, VERGE VM & PERSSON H (1993). Differential expression of mRNAs for neurotrophins and their receptors after axotomy of the sciatic nerve. *J Cell Biol*, 123, 455-65.
- GARBAY B, HEAPE AM, SARGUEIL F & CASSAGNE C (2000). Myelin synthesis in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol*, 61, 267-304.
- GEUNA S, GIGO-BENATO D & RODRIGUES ADE C (2004). On sampling and sampling errors in histomorphometry of peripheral nerve fibers. *Microsurgery*, 24, 72-6.
- GODDARD DR, BERRY M, KIRVELL SL & BUTT AM (2001). Fibroblast growth factor-2 inhibits myelin production by oligodendrocytes in vivo. *Mol Cell Neurosci*, 18, 557-69.
- GOMEZ N, CUADRAS J, BUTI M & NAVARRO X (1996). Histologic assessment of sciatic nerve regeneration following resection and graft or tube repair in the mouse. *Restor Neurol Neurosci*, 10, 187-196.
- GORDON T, SULAIMAN OA & BOYD JG (2003). Experimental strategies to promote functional recovery after peripheral nerve injuries. *Journal of the Peripheral Nervous System*, 8, 236-250.
- GRAFSTEIN B (1983). Chromatolysis reconsidered: a new view of the reaction of the nerve body to axon injury. In *Nerve, organ and tissue regeneration-perspectives of research work*. Academic Press, New York, S. 37-50.
- GRANT M, MAMES R, FITZGERALD C, ELLIS E, ABOUFRIEKHA M & GUY J (1993). Insulin-like growth factor I acts as an angiogenic agent in rabbit cornea and retina: comparative studies with basic fibroblast growth factor. *Diabetologia*, 36, 282-291.
- GRIFFIN JW, GEORGE R, LOBATO C, TYOR WR, YAN LC & GLASS JD (1992). Macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration: relevance to immune-mediated demyelination. *J Neuroimmunol*, 40, 153-65.
- GROTHE C, HEESE K, MEISINGER C, WEWETZER K, KUNZ D, CATTINI P & OTTEN U (2000). Expression of interleukin-6 and its receptor in the sciatic nerve and cultured Schwann cells: relation to 18-kD fibroblast growth factor-2. *Brain Res*, 885, 172-81.

- GROTHE C, MEISINGER C & CLAUS P (2001). In vivo expression and localization of the fibroblast growth factor system in the intact and lesioned rat peripheral nerve and spinal ganglia. *J Comp Neurol*, 434, 342-57.
- GROTHE C, MEISINGER C, HERTENSTEIN A, KURZ H & WEWETZER K (1997). Expression of fibroblast growth factor-2 and fibroblast growth factor receptor 1 messenger RNAs in spinal ganglia and sciatic nerve: regulation after peripheral nerve lesion. *Neuroscience*, 76, 123-35.
- GROTHE C & NIKKHAH G (2001). The role of basic fibroblast growth factor in peripheral nerve regeneration. *Anat Embryol (Berl)*, 204, 171-7.
- GUENARD V, KLEITMAN N, MORRISSEY TK, BUNGE RP & AEBISCHER P (1992). Syngeneic Schwann cells derived from adult nerves seeded in semipermeable guidance channels enhance peripheral nerve regeneration. *J Neurosci*, 12, 3310-20.
- GULATI AK, RAI DR & ALI AM (1995). The influence of cultured Schwann cells on regeneration through acellular basal lamina grafts. *Brain Res*, 705, 118-24.
- GUNTINAS-LICHIUS O, ANGELOV DN, TOMOV TL, DRAMIGA J, NEISS WF & WEWETZER K (2001). Transplantation of olfactory ensheathing cells stimulates the collateral sprouting from axotomized adult rat facial motoneurons. *Exp Neurol*, 172, 70-80.
- GUNTINAS-LICHIUS O, IRINTCHEV A, STREPPPEL M, LENZEN M, GROSHEVA M, WEWETZER K, NEISS WF & ANGELOV DN (2005). Factors limiting motor recovery after facial nerve transection in the rat: combined structural and functional analyses. *European Journal of Neuroscience*, 21, 391-402.
- HAASTERT K, GROSSKREUTZ J, JAECKEL M, LADERER C, BUFLER J, GROTHE C & CLAUS P (2005). Rat embryonic motoneurons in long-term co-culture with Schwann cells-a system to investigate motoneuron diseases on a cellular level in vitro. *J Neurosci Methods*, 142, 275-84.
- HARE GM, EVANS PJ, MACKINNON SE, BEST TJ, MIDHA R, SZALAI JP & HUNTER DA (1993). Walking track analysis: utilization of individual footprint parameters. *Ann Plast Surg*, 30, 147-53.

- HEBE BRAND D, ZOHMAN G & JONES NF (1997). Nerve xenograft transplantation. Immunosuppression with FK-506 and RS-61443. *J Hand Surg [Br]*, 22, 304-7.
- HIRATA K & KAWABUCHI M (2002). Myelin phagocytosis by macrophages and nonmacrophages during Wallerian degeneration. *Microsc Res Tech*, 57, 541-7.
- HO P, COAN G, CHENG E, NIELL C, TARN D, ZHOU H, SIERRA D & TERRIS DJ (1998). Repair With Collagen Tubules Linked With Brain-Derived Neurotrophic Factor and Ciliary Neurotrophic Factor in a Rat Sciatic nerve Injury Model. *Arch Orthop Trauma Surg*, 124, 761-766.
- HOBSON MI, GREEN CJ & TERENGI G (2000). VEGF enhances intraneural angiogenesis and improves nerve regeneration after axotomy. *J Anat*, 197 Pt 4, 591-605.
- IDE C, TOHYAMA K, TAJIMA K, ENDOH K, SANO K, TAMURA M, MIZOGUCHI A, KITADA M, MORIHARA T & SHIRASU M (1998). Long acellular nerve transplants for allogeneic grafting and the effects of basic fibroblast growth factor on the growth of regenerating axons in dogs: a preliminary report. *Exp Neurol*, 154, 99-112.
- IJKEMA-PAASSEN J, JANSSEN K, GRAMSBERGEN A & MEEK MF (2004). Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. *Biomaterials*, 25, 1583-92.
- JENQ CB, CHUNG K & COGGESHALL RE (1986). Postnatal loss of axons in normal rat sciatic nerve. *J Comp Neurol*, 244, 445-50.
- JOHNSON I (2004). Morphological Peculiarities of the Neuron. In *Brain Damage and Repair*. eds HERDEGEN T & DELGADO-GARCIA J. pp. 33-45. Dordrecht Boston London: Kluwer Academic Press.
- JUNGnickel J, CLAUS P, GRANSALKE K, TIMMER M & GROTHE C (2004). Targeted disruption of the FGF-2 gene affects the response to peripheral nerve injury. *Mol Cell Neurosci*, 25, 444-52.
- JUNQUEIRA L, CARNEIRO J & KELLY R (2002). Nervengewebe und Nervensystem. In *Histologie*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, S. 107-141.

- KANDEL E, SCHWARTZ J & JESSEL T (1996). *Neurowissenschaften*. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford.
- KAWASAKI Y, YOSHIMURA K, HARI K & PARK S (2000). Identification of myelinated motor and sensory axons in a regenerating mixed nerve. *J Hand Surg [Am]*, 25, 104-11.
- KLAPDOR K, DULFER BG, HAMMANN A & VAN DER STAAY FJ (1997). A low-cost method to analyse footprint patterns. *J Neurosci Methods*, 75, 49-54.
- KRÄMER E & TROTTER J (2004). Axon-Glia-Interaktion und Myelinisierung- oder wie ein erster Kuss in Umhüllung resultiert. *Neuroforum*, 4, 268-275.
- LÜLLMANN-RAUCH R (2003). *Histologie*. 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York.
- LUNDBORG G (2004). Alternatives to autologous nerve grafts. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 36, 1-7.
- LUNDBORG G, DAHLIN LB, DANIELSEN N, GELBERMAN RH, LONGO FM, POWELL HC & VARON S (1982). Nerve regeneration in silicone chambers: influence of gap length and of distal stump components. *Exp Neurol*, 76, 361-75.
- LUNDBORG G & ROSEN B (2003). Nerve injury and repair - a challenge to the plastic brain. *J Peripher Nerv Syst*, 8, 209-26.
- MADISON R, DA SILVA CF, DIKES P, CHIU TH & SIDMAN RL (1985). Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioresorbable nerve guides and a laminin-containing gel. *Exp Neurol*, 88, 767-72.
- MARCOL W, KOTULSKA K, SWIECH-SABUDA E, LARYSZ-BRYSZ M, GOLKA B, GORKA D & LEWIN-KOWALIK J (2003). Regeneration of sciatic nerves of adult rats induced by extracts from distal stumps of pre-degenerated peripheral nerves. *J Neurosci Res*, 72, 417-24.
- MARKUS A, PATEL TD & SNIDER WD (2002). Neurotrophic factors and axonal growth. *Curr Opin Neurobiol*, 12, 523-31.

- MATSUMOTO K, OHNISHI K, KIYOTANI T, SEKINE T, UEDA H, NAKAMURA T, ENDO K & SHIMIZU Y (2000). Peripheral nerve regeneration across an 80-mm gap bridged by a polyglycolic acid (PGA)-collagen tube filled with laminin-coated collagen fibers: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Res*, 868, 315-28.
- MAURITZ C, GROTHE C & HAASTERT K (2004a). Comparative study of cell culture and purification methods to obtain highly enriched cultures of proliferating adult rat Schwann cells. *J Neurosci Res*, 77, 453-61.
- MAURITZ C, GROTHE C, MATTHIES C & HAASTERT K (2004b). Adult rat and human Schwann cells suitable for cell transplantation in peripheral nerve repair - comparative studies on pre-treatment of nerve tissue, culture conditions and cell enrichment as well as establishment of transfection protocols. In *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft, Supplement zum 187. Band des Anatomischen Anzeigers -Annals of Anatomy*-. ed. KUEHNEL W. pp. 281. 21. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, Germany: Elsevier - Urban & Fischer.
- MEEK MF, DEN DUNNEN WF, H.L. B, PENNINGS AJ, ROBINSON PH, FRCS & SCHAKENRAAD JM (1997). Peripheral nerve regeneration and functional nerve recovery after reconstruction with an thin-walled biodegradable poly (DL-lactide-e-caprolactone) nerve guide. *Cells and Materials*, 7, 53-62.
- MEEK MF, DEN DUNNEN WF, ROBINSON PH, PENNINGS AJ & SCHAKENRAAD JM (1997). Evaluation of functional nerve recovery after reconstruction with a new biodegradable poly (DL-lactide-epsilon-caprolactone) nerve guide. *Int J Artif Organs*, 20, 463-8.
- MEEK MF, DEN DUNNEN WF, SCHAKENRAAD JM & ROBINSON PH (1999a). Evaluation of several techniques to modify denatured muscle tissue to obtain a scaffold for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 20, 401-8.
- MEEK MF, DEN DUNNEN WF, SCHAKENRAAD JM & ROBINSON PH (1999b). Long-term evaluation of functional nerve recovery after reconstruction with a thin-walled biodegradable poly (DL-lactide-epsilon-caprolactone) nerve guide, using walking track analysis and electrostimulation tests. *Microsurgery*, 19, 247-53.
- MEEK MF, KONING MA, NICOLAI JP & GRAMSBERGEN A (2004). Rehabilitation strategy using enhanced housing environment during neural regeneration. *J Neurosci Methods*, 136, 179-85.

- MEEK MF, ROBINSON PH, STOKROOS I, BLAAUW EH, KORS G & DEN DUNNEN WF (2001). Electronmicroscopical evaluation of short-term nerve regeneration through a thin-walled biodegradable poly(DLLA-epsilon-CL) nerve guide filled with modified denatured muscle tissue. *Biomaterials*, 22, 1177-85.
- MEISINGER C & GROTHE C (1997). Differential regulation of fibroblast growth factor (FGF)-2 and FGF receptor 1 mRNAs and FGF-2 isoforms in spinal ganglia and sciatic nerve after peripheral nerve lesion. *J Neurochem*, 68, 1150-8.
- MIDHA R, MUNRO CA, DALTON PD, TATOR CH & SHOICHET MS (2003). Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J Neurosurg*, 99, 555-65.
- MILLESINI H (1997). Brachial plexus injuries in adults. *Orthopade*, 26, 590-8.
- MORGAN L, JESSEN KR & MIRSKY R (1994). Negative regulation of the P0 gene in Schwann cells: suppression of P0 mRNA and protein induction in cultured Schwann cells by FGF2 and TGF beta 1, TGF beta 2 and TGF beta 3. *Development*, 120, 1399-409.
- MOSAHEBI A, FULLER P, WIBERG M & TERENGI G (2002). Effect of allogeneic Schwann cell transplantation on peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol*, 173, 213-23.
- MULLER-OSTERMEYER F, CLAUS P & GROTHE C (2001). Distinctive effects of rat fibroblast growth factor-2 isoforms on PC12 and Schwann cells. *Growth Factors*, 19, 175-91.
- MUMENTHALER M, SCHLIACK H & STÖHR M (1998). Läsionen peripherer Nerven und radikuläre Syndrome. 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York, S. 15-28.
- NAGANO A, TSUYAMA N, HARA T & SUGIOKA H (1984). Brachial plexus injuries. Prognosis of postganglionic lesions. *Arch Orthop Trauma Surg*, 102, 172-8.
- NAKAMURA T, INADA Y, FUKUDA S, YOSHITANI M, NAKADA A, ITOI S, KANEMARU S, ENDO K & SHIMIZU Y (2004). Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube. *Brain Res*, 1027, 18-29.

- NAVARRO X, RODRIGUEZ FJ, CEBALLOS D & VERDU E (2003). Engineering an artificial nerve graft for the repair of severe nerve injuries. *Med Biol Eng Comput*, 41, 220-6.
- NEUBERG D, CARENINI S, SCHACHNER M & MARTINI R (1998). Accelerated demyelination of peripheral nerves in mice deficient in connexin 32 and protein zero. *J Neurosci Res*, 53, 542-550.
- NIKKHAH G, CARVALHO GA & SAMII M (1997). Nerventransplantation und Neurolyse des Plexus brachialis nach posttraumatischen Läsionen. *Orthopäde*, 26, 612-620.
- NOVIKOV LN, NOVIKOVA LN, MOSAHEBI A, WIBERG M, TERENCEHI G & KELLERTH JO (2002). A novel biodegradable implant for neuronal rescue and regeneration after spinal cord injury. *Biomaterials*, 23, 3369-76.
- OKUMURA M, OKUDA T, NAKAMURA T & YAJIMA M (1996). Effect of basic fibroblast growth factor on wound healing in healing-impaired animal models. *Arzneimittelforschung*, 46, 547-51.
- OLIVEIRA EF, MAZZER N, BARBIERI CH & SELLI M (2001). Correlation between functional index and morphometry to evaluate recovery of the rat sciatic nerve following crush injury: experimental study. *J Reconstr Microsurg*, 17, 69-75.
- ORNITZ DM & ITOH N (2001). Fibroblast growth factors. *Genome Biol*, 2, 3005.1-3005.2
- ORNITZ DM, XU J, COLVIN JS, MCEWEN DG, MACARTHUR CA, COULIER F, GAO G & GOLDFARB M (1996). Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem*, 271, 15292-7.
- OTTO D, UNSICKER K & GROTHE C (1987). Pharmacological effects of nerve growth factor and fibroblast growth factor applied to the transected sciatic nerve on neuron death in adult rat dorsal root ganglia. *Neurosci Lett*, 83, 156-60.
- OZMEN S, AYHAN S, LATIFOGLU O & SIEMIONOW M (2002). Stamp and paper method: a superior technique for the walking track analysis. *Plast Reconstr Surg*, 109, 1760-1.

- PAPAKONSTANTINOUCHE KC, SHIAMISHIS G, BATES M & TERZIS JK (2002). Distraction osteogenesis using IGF-I after nerve microreconstruction. *J Reconstr Microsurg*, 18, 401-10.
- PATEL TD, JACKMAN A, RICE FL, KUCERA J & SNIDER WD (2000). Development of sensory neurons in the absence of NGF/TrkA signaling in vivo. *Neuron*, 25, 345-57.
- PATEL TD, KRAMER I, KUCERA J, NIEDERKOFER V, JESSELL TM, ARBER S & SNIDER WD (2003). Peripheral NT3 signaling is required for ETS protein expression and central patterning of proprioceptive sensory afferents. *Neuron*, 38, 403-16.
- PUIGDELLIVOL-SANCHEZ A, PRATS-GALINO A, RUANO-GIL D & MOLANDER C (2000). Fast blue and diamidino yellow as retrograde tracers in peripheral nerves: efficacy of combined nerve injection and capsule application to transected nerves in the adult rat. *J Neurosci Methods*, 95, 103-10.
- RAIVICH G & KREUTZBERG GW (1993). Peripheral nerve regeneration: role of growth factors and their receptors. *Int J Dev Neurosci*, 11, 311-24.
- RODRIGUEZ FJ, GOMEZ N, PEREGO G & NAVARRO X (1999). Highly permeable polylactide-caprolactone nerve guides enhance peripheral nerve regeneration through long gaps. *Biomaterials*, 20, 1489-500.
- RODRIGUEZ FJ, VERDU E, CEBALLOS D & NAVARRO X (2000). Nerve guides seeded with autologous schwann cells improve nerve regeneration. *Exp Neurol*, 161, 571-84.
- RUTKOWSKI GE, MILLER CA, JEFTINIJA S & MALLAPRAGADA SK (2004). Synergistic effects of micropatterned biodegradable conduits and Schwann cells on sciatic nerve regeneration. *J Neural Eng*, 1, 151-157.
- SCHMALBRUCH H (1986). Fiber composition of the rat sciatic nerve. *Anat Rec*, 215, 71-81.
- SCHMIDT CE & LEACH JB (2003). Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration. *Annu Rev Biomed Eng*, 5, 293-347.
- SCHULTZE O (1910). Über die Anwendung von Aminosäure und eine neue Osmiumhämatoxylinmethode. *Z. Wiss. Mikr.*, 27, 465-475.

- SEDDON H (1943). Three types of injury. *Brain*, 66, 237-288.
- SIMON M, PORTER R, BROWN R, COULTON GR & TERENGIHI G (2003). Effect of NT-4 and BDNF delivery to damaged sciatic nerves on phenotypic recovery of fast and slow muscles fibres. *Eur J Neurosci*, 18, 2460-6.
- SPOREL-OZAKAT RE, EDWARDS PM, HEPGUL KT, SAVAS A & GISPEN WH (1991). A simple method for reducing autotomy in rats after peripheral nerve lesions. *J Neurosci Methods*, 36, 263-5.
- STERNE GD, COULTON GR, BROWN RA, GREEN CJ & TERENGIHI G (1997). Neurotrophin-3-enhanced nerve regeneration selectively improves recovery of muscle fibers expressing myosin heavy chains 2b. *J Cell Biol*, 139, 709-15.
- STÖHR M & KRAUS R (2002). Elektromyographie und Neurographie. In *Einführung in die klinische Neuropsychologie*. Steinkopf Verlag, Darmstadt, S. 1-46.
- STOLL G, JANDER S & MYERS RR (2002). Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst*, 7, 13-27.
- STOLL G & MULLER HW (1999). Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. *Brain Pathol*, 9, 313-25.
- STRASBERG JE, STRASBERG S, MACKINNON SE, WATANABE O, HUNTER DA & TARASIDIS G (1999). Strain differences in peripheral-nerve regeneration in rats. *J Reconstr Microsurg*, 15, 287-93.
- SUNDERLAND S (1951). A classification of peripheral nerve injuries producing loss of function. *Brain*, 74, 491-516.
- TERENGIHI G (1999). Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J Anat*, 194, 1-14.
- TERRIS DJ, TOFT K, MOIR MS, LUM J & WANG M (2001). Brain-Derived Neurotrophic Factor-Enriched Collagen Tubule as a Substitute for Autologous Nerve Grafts. *Arch Orthop Trauma Surg*, 127, 294-298.

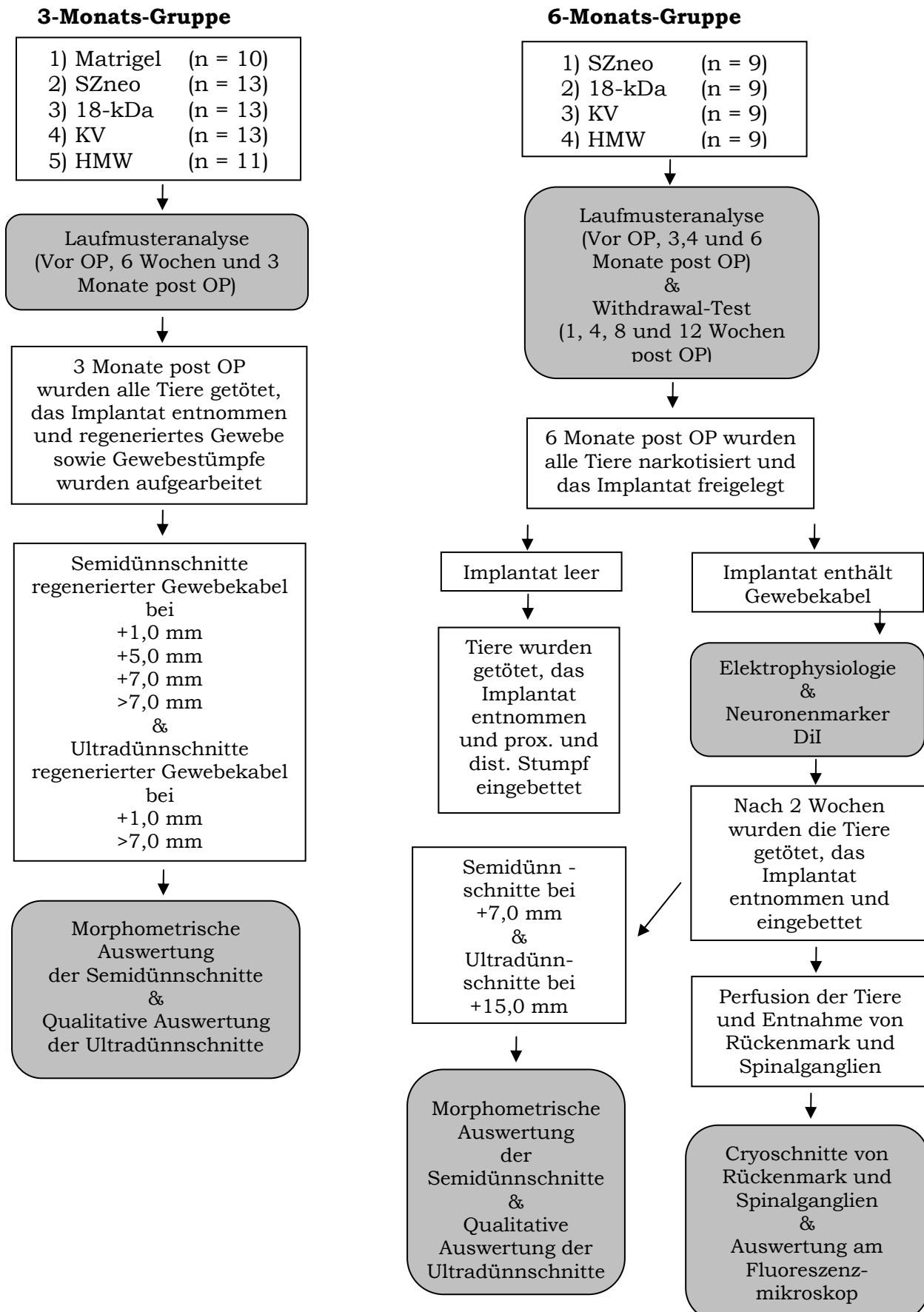
- TIMMER M, MULLER-OSTERMEYER F, KLOTH V, WINKLER C, GROTHE C & NIKKHAH G (2004). Enhanced survival, reinnervation, and functional recovery of intrastriatal dopamine grafts co-transplanted with Schwann cells overexpressing high molecular weight FGF-2 isoforms. *Exp Neurol*, 187, 118-36.
- TIMMER M, ROBBEN S, MÜLLER-OSTERMEYER F, NIKKHAH G & GROTHE C (2003). Axonal regeneration across long gaps in silicone chambers filled with Schwann cells over-expressing high molecular weight FGF-2.
- TOLWANI RJ, COSGAYA JM, VARMA S, JACOB R, KUO LE & SHOOTER EM (2004). BDNF overexpression produces a long-term increase in myelin formation in the peripheral nervous system. *J Neurosci Res*, 77, 662-9.
- TORIGOE K, TANAKA HF, TAKAHASHI A, AWAYA A & HASHIMOTO K (1996). Basic behavior of migratory Schwann cells in peripheral nerve regeneration. *Exp Neurol*, 137, 301-8.
- UDINA E, CEBALLOS D, GOLD BG, NAVARRO X & DIETZMANN K (2003). FK506 enhances reinnervation by regeneration and by collateral sprouting of peripheral nerve fibers. *Exp Neurol*, 183, 220-31.
- VALERO-CABRE A & NAVARRO X (2002). Functional impact of axonal misdirection after peripheral nerve injuries followed by graft or tube repair. *J Neurotrauma*, 19, 1475-85.
- VALERO-CABRE A, TSIRONIS K, SKOURAS E, PEREGO G, NAVARRO X & NEISS WF (2001). Superior muscle reinnervation after autologous nerve graft or poly-L-lactide-epsilon-caprolactone (PLC) tube implantation in comparison to silicone tube repair. *J Neurosci Res*, 63, 214-23.
- VAN MEETEREN NL, BRAKKEE JH, HAMERS FP, HELDERS PJ & GISPEN WH (1997a). Exercise training improves functional recovery and motor nerve conduction velocity after sciatic nerve crush lesion in the rat. *Arch Phys Med Rehabil*, 78, 70-7.
- VAN MEETEREN NL, BRAKKEE JH, HELDERS PJ, WIEGANT VM & GISPEN WH (1997b). Functional recovery from sciatic nerve crush lesion in the rat correlates with individual differences in responses to chronic intermittent stress. *J Neurosci Res*, 48, 524-32.

- VAREJAO AS, MEEK MF, FERREIRA AJ, PATRICIO JA & CABRITA AM (2001). Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis. *J Neurosci Methods*, 108, 1-9.
- VERDU E, NAVARRO X, GUDINO-CABRERA G, RODRIGUEZ FJ, CEBALLOS D, VALERO A & NIETO-SAMPEDRO M (1999). Olfactory bulb ensheathing cells enhance peripheral nerve regeneration. *Neuroreport*, 10, 1097-101.
- VLEGGEERT-LANKAMP CL, VAN DEN BERG RJ, FEIRABEND HK, LAKKE EA, MALESSY MJ & THOMEER RT (2004). Electrophysiology and morphometry of the Aalpha- and Abeta-fiber populations in the normal and regenerating rat sciatic nerve. *Exp Neurol*, 187, 337-49.
- WALLER A (1850). Experminets on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations of the alterrations produced thereby in the structure of their primitive fibres. *Phil Trans R Soc Lond (Biol)*, 140, 423-429.
- WANG S, CAI Q, HOU J, BEI J, ZHANG T, YANG J & WAN Y (2003). Acceleration effect of basic fibroblast growth factor on the regeneration of peripheral nerve through a 15-mm gap. *J Biomed Mater Res*, 66A, 522-31.
- WEBER RA, PROCTOR WH, WARNER MR & VERHEYDEN CN (1993). Autotomy and the sciatic functional index. *Microsurgery*, 14, 323-7.
- WEBER RA, WARNER MR, VERHEYDEN CN & PROCTOR WH (1996). Functional evaluation of gap vs. abutment repair of peripheral nerves in the rat. *J Reconstr Microsurg*, 12, 159-63.
- XU X, YEE WC, HWANG PY, YU H, WAN AC, GAO S, BOON KL, MAO HQ, LEONG KW & WANG S (2003). Peripheral nerve regeneration with sustained release of poly(phosphoester) microencapsulated nerve growth factor within nerve guide conduits. *Biomaterials*, 24, 2405-12.
- XU XM, GUENARD V, KLEITMAN N, AEBISCHER P & BUNGE MB (1995). A combination of BDNF and NT-3 promotes supraspinal axonal regeneration into Schwann cell grafts in adult rat thoracic spinal cord. *Exp Neurol*, 134, 261-72.
- YAO M, MOIR MS, WANG MZ, TO MP & TERRIS DJ (1999). Peripheral nerve regeneration in CNTF knockout mice. *Laryngoscope*, 109, 1263-8.

- YOUNG C, MILLER E, NICKLOUS DM & HOFFMAN JR (2001). Nerve growth factor and neurotrophin-3 affect functional recovery following peripheral nerve injury differently. *Restor Neurol Neurosci*, 18, 167-75.
- ZHANG F, BLAIN B, BECK J, ZHANG J, CHEN Z, CHEN ZW & LINEAWEAVER WC (2002). Autogenous venous graft with one-stage prepared Schwann cells as a conduit for repair of long segmental nerve defects. *J Reconstr Microsurg*, 18, 295-300.
- ZHANG F, INSERRA M, RICHARDS L, TERRIS DJ & LINEAWEAVER WC (2001). Quantification of nerve tension after nerve repair: correlations with nerve defects and nerve regeneration. *J Reconstr Microsurg*, 17, 445-51.
- ZHAO Q, DAHLIN LB & KANJE M (1992). Reinnervation of muscles in rats after repair of transected sciatic nerves with Y-shaped and X-shaped silicone tubes. Muscle reinnervation after nerve repair. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 26, 265-70.
- ZHAO Q, LUNDBORG G, DANIELSEN N, BJURSTEN LM & DAHLIN LB (1997). Nerve regeneration in a 'pseudo-nerve' graft created in a silicone tube. *Brain Res*, 769, 125-34.

VII. Anhang

Abb. 24 Übersicht des Versuchsdesigns



Tab. 1 Tabelle zur Übersicht des Versuchsdesigns (*in Matrigel suspendiert)

Tiergruppe	Implantat befüllt mit	n	Funktionelle Untersuchungen	Weitere Untersuchungen	Semidünn Schnitte	Ultradünn Schnitte	Quantitativ ausgewertete Parameter
3-Monats- Gruppe	1) Matrigel	10	Laufmuster Analyse		+1,0 mm	+1,0 mm >7,0 mm	1) Anzahl regenerierter Gewebe-kabel
	2) SZneo*	13			+5,0 mm		2) Distanz regener., myel. Fasern
	3) 18-kDa*	13			+7,0 mm		3) Anzahl myel. Axone
	4) KV*	13			>7,0 mm		4) Durchmesser myel. Axone
	5) HMW*	11					5) g-ratio myel. Axone 6) Gefäßanteil
6-Monats- Gruppe	1) SZneo*	9	Laufmuster Analyse & Withdrawal Test	Elektrophysiologie & retrograde, neuronale Markierung	+7,0 mm +15,0 mm	+15,0 mm	1) Anzahl retrograd markierter Neurone im Rückenmark und den Spinalganglien-wurzeln
	2) 18-kDa*	9					2) Anzahl an Gewebe-kabeln mit durch-gehenden myel. Axonen
	3) KV*	9					3) Anzahl myel Axonen
	4) HM*W	9					4) Durchmesser myel Axone 5) g-ratio myel. Axone

Tab. 2 Übersicht der morphometrischen Ergebnisse.
* interpolierte Werte

Anzahl regenerierter myelinisierter Axone						Querschnittsfläche in mm ²			
Tier- gruppe	n	+1,0 mm*	+5,0 mm	+7,0 mm	>7,0 mm	+1,0 mm*	+5,0 mm	+7,0 mm	>7,0 mm
Matrigel	2	31002 & 20890	354	95		1,44 & 1,33	0,10	0,04	
SZneo	7	16641 ± 2618	1073 ± 505	979 ± 479	117 ± 53	1,39 ± 0,22	0,11 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,07 ± 0,02
18-kDa	6	9116 ± 4594	1394 ± 476	939 ± 224	1266 ± 259	0,60 ± 0,28	0,08 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,13 ± 0,03
KV	5	10076 ± 6495	881 ± 345	595 ± 392	301 ± 187	0,56 ± 0,27	0,08 ± 0,04	0,07 ± 0,03	0,30 ± 0,16
HMW	7	6689 ± 1623	1928 ± 465	1393 ± 411	1161 ± 400	0,44 ± 0,09	0,12 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,41 ± 0,18
Nervendichte / mm ²						g-ratio			
Tier- gruppe	n	+1,0 mm*	+5,0 mm	+7,0 mm	>7,0 mm	+1,0 mm*	+5,0 mm	+7,0 mm	>7,0 mm
Matrigel	2	21546 & 15656	3477	3477		0,71 & 0,74	0,72	0,72	
SZneo	7	13343 ± 1685	8641 ± 2992	8641 ± 2992	1826 ± 771	0,73 ± 0,007	0,71 ± 0,008	0,73 ± 0,005	0,72 ± 0,004
18-kDa	6	14287 ± 2051	17877 ± 5011	17877 ± 5011	1675 ± 1526	0,75 ± 0,009	0,73 ± 0,006	0,73 ± 0,017	0,75 ± 0,007
KV	5	12701 ± 2359	13952 ± 4534	13952 ± 4534	10170 ± 3854	0,76 ± 0,007	0,71 ± 0,012	0,73 ± 0,015	0,75 ± 0,023
HMW	7	15293 ± 1547	16086 ± 2017	16086 ± 2017	4107 ± 1017	0,76 ± 0,005	0,75 ± 0,010	0,74 ± 0,005	0,71 ± 0,009

DANKE

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen, mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben und immer für mich da waren:

Frau Prof. Claudia Grothe danke ich für die Überlassung dieses Themas und besonders für die Unterstützung während der Arbeit und in der Phase des Zusammenschreibens.

Dr. Kirsten Haastert danke ich für die umfangreiche Betreuung während meiner Doktorarbeit, für die tatkräftige Unterstützung dieser Studie, für das bereitwillige Beantworten meiner vielen Fragen und für das Korrekturlesen und Ausmerzen umständlicher Formulierungen in dieser Arbeit.

Natascha (Taschi) Heidrich danke ich für die tolle und immer freundliche Hilfe und Unterstützung im Labor und der Elektronenmikroskopie. Außerdem danke ich ihr dafür, dass sie immer Zeit für mich hatte und eine richtig gute Freundin für mich geworden ist.

Marco Timmer danke ich zum einen für die Bereitstellung des Computermakros ohne das die morphometrische Auswertung nicht möglich gewesen wäre, und zum anderen für seinen recht eigenen und originellen Humor (...).

Dr. Peter Claus danke ich dafür, dass er die für die Zelltransfektionen benötigten Plasmide zur Verfügung gestellt hat.

Dr. Martin Fischer danke ich für seine geduldige Hilfe und Mitarbeit bei den elektrophysiologischen Messungen.

Fr. Dr. Matthies hat uns für die elektrophysiologischen Messungen freundlicherweise eine elektronische Stimulationseinheit und einen Elektromyographen zur klinischen Anwendung zur Verfügung gestellt.

Prof. Angelov danke ich für die vielen hilfreichen Tipps bzgl. der Anwendung des retrograd transportierten Neuronenmarkers DiI.

Prof. Klapdor und Kollegen danke ich dafür, dass ich zum Ausmessen der Fussabdrücke ihr Computerprogramm Footprint 1.22 verwenden durfte.

Christina Mauritz danke ich für die vielen lustigen Stunden in unserem gemeinsamen Arbeitszimmer, für ihre Hilfe und Geduld, wenn es um anatomische Fragen ging, für unseren gemeinsamen Kampf (leider nicht immer erfolgreich) gegen die Microsoft Office Programme und für ihre Freundschaft.

Mein Dank gilt auch Dr. Julia Jungnickel, die in Zeiten des Platzmangels Christina und mir Unterschlupf gewährt hat und mir mit ihrem Fachwissen gerne zur Seite stand.

Meinen Mit-Doktoranden Kathrin Schlarmann, Alexander Bruns, Jeroen van Bergeijk, Konstantin Cesnulevicius, Yohannes Haile, Kristina Haase und Gunther Baillot danke ich einfach für die schöne Zeit, die wir hatten und wünsche ihnen an dieser Stelle noch ganz viel Glück!

Den anderen Mitarbeitern (Günter Braun, Hella Brinkmann, Maike Wesemann, Fr. Heike, Herrn Rust, Kais Hussein, Birgit Steuber) der Abteilung Neuroanatomie der MHH möchte ich dafür danken, dass sie mich so freundlich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen haben und dass wir viele nette und informative Stunden im Kaffeeraum hatten. Besonders danke ich Hildegard Streich, die mich in die Kunst des Cryoschneidens eingewiesen hat und Kerstin Kuhleemann, die immer einen guten Tipp in immunhistologischen Fragen für mich hatte. An dieser Stelle möchte ich mich auch noch bei Jürgen Wittek bedanken, der mich mit seinen tollen Witzen immer zum Lachen bringen konnte.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Familie, meinen Eltern Roswitha & Djuro Lipokatic, die mir diese Ausbildung ermöglicht haben und immer für mich da waren. Meinen Schwestern Anja & Becci und deren Freunden Olaf & Paul und meiner Nichte Zoe danke ich für ihre Motivation. Besonderer Dank gilt auch meiner Oma Käthe Krumbholz.

Meinen besten Freundinnen Kathrin Welp, Annika Herwig und Babsi Kleczka danke ich dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für meine Sorgen und Probleme hatten und für mich da waren.

Als letztes möchte ich mich bei dem wichtigsten Menschen in meinem Leben bedanken: Danke Atti, dass Du immer für mich da bist, dass Du so bist wie du bist und dass du „es genauso siehst, in etwa so wie ich“.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Lipokatic
Vorname: Esther
Adresse: Redenstrasse 12
30171 Hannover
Geburtstag: 21.06.75
Geburtsort: Hildesheim
Familienstand: ledig



Schulbildung: 1982-1986 Grundschule Emmerke
1986-1988 Orientierungsstufe Himmelsthür
1988-1995 Gymnasium Himmelsthür
Juni 1995 Schulabschluss mit Abitur

Ausbildung: 1995-1996 Ausbildung als Bauzeichnerin im
Architekturbüro Jung in Hildesheim

Studium: Oktober 1996 Beginn des Biologiestudiums an der
Universität Hannover

Juni 2001 Diplomarbeit am Institut für Zoologie der
Tierärztlichen Hochschule Hannover bei
Herrn Prof. Steinlechner

Thema der Diplomarbeit: Altersabhängiges Verhalten:
Vergleichende Untersuchungen zur Aktivitätsrhythmik von
Dsungarischen Zwerghamstern und Grauen Mausmakis

Juli 2002 Abschluss des Biologiestudiums mit
Hochschulgrad Diplom-Biologin an der
Universität Hannover

November 2002 Beginn der Promotion in der Abteilung
Neuronanatomie der Medizinischen
Hochschule Hannover bei Frau Prof. Grothe

Thema der Promotion: Funktionelle und histologische
Untersuchungen der FGF-2-Isoformen am Regenerationsmodell
des durchtrennten Nervus ischiadicus der adulten Ratte –
Transplantation genetisch modifizierter Schwann-Zellen

November 2005 Abschluß der Promotion mit dem Hochschul-
grad Dr. rer. nat. an der Universität Hannover

PUBLIKATIONEN

HAASTERT, K* AND LIPOKATIC E*, FISCHER M, TIMMER M, GROTHE C (2005). Differentially promoted peripheral nerve regeneration by grafted Schwann cells over-expressing different FGF-2-isoforms. *Neurobiology of Disease*, *In press*

* contributed equally

LIPOKATIC E, TIMMER M, GROTHE C & HAASTERT K (2004). Schwann cells over-expressing high molecular weight fibroblast growth factor-2 (FGF-2) promote axonal regeneration in long term peripheral nerve repair across long gaps. In *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft, Supplement zum 187. Band des Anatomischen Anzeigers -Annals of Anatomy-*. ed. KUEHNEL W. pp. 277. 21. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft, Würzburg, Germany: Elsevier - Urban & Fischer.

HAASTERT K, MAURITZ C, LIPOKATIC E, TIMMER M & GROTHE C (2004). Towards regenerative therapy: Adult Schwann cells and 21/23kDa-FGF-2-isoforms - genetic engineering and regenerative capacities in peripheral nerve repair across long gaps. In *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft, Supplement zum 187. Band des Anatomischen Anzeigers -Annals of Anatomy-*. ed. KUEHNEL W. pp. 212. Würzburg, Germany: Elsevier - Urban & Fischer.

LIPOKATIC E, GROTHE C & HAASTERT K (2003). Analyses of regeneration properties of Schwann cells over-expressing basic fibroblast growth factor (FGF-2) in long term peripheral nerve repair across long gaps. In *Verhandlungen der Anatomischen Gesellschaft, Supplement zum 186. Band des Anatomischen Anzeigers -Annals of Anatomy-*. ed. KUEHNEL W. pp. 254-255. Würzburg, Germany: Elsevier - Urban & Fischer.

LIPOKATIC E, PERL F, STEINLECHNER S (2002). Attempt to characterize the physiological age of Djungarian Dwarf Hamsters (*Phodopus sungorus*) by testing their behavior in an open-field and analysing their locomotion pattern and their activity rhythm. In *Zoology 105, Supplement V (DZG 95.1)*.